



Universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Probenvorbereitung mit Sol – Gel –
Immunaффinitätssäulen zur Bestimmung der Mykotoxine
Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebens– und
Futtermitteln“

Verfasserin

Mag. rer. nat. Zdenka Blasina

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2010

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 091 419

Dissertationsgebiet lt.
Studienblatt:

Chemie

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Gerhard Sontag

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2005 bis September 2007 am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien

Ich möchte mich bei dem Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (FWF) für die finanzielle Unterstützung bedanken. Diese Dissertation entstand im Rahmen des FWF Projekts Nr. L98 – B10.

Besonderer Dank gilt Frau Ao. Univ. Prof. Margit Cichna – Markl und Herrn Univ. Prof. Gerhard Sontag für die umfassende und kompetente Betreuung meiner Dissertation und die genauen Korrekturen dieser Arbeit.

Weiters gilt mein Dank Herrn Ao. Univ. Prof. Ebrahim Razzazi – Fazeli und Frau Dr. Christina Böhm, die ebenfalls an dem FWF Projekt beteiligt waren, für die gute Zusammenarbeit und Herrn Ao. Univ. Prof. Ebrahim Razzazi – Fazeli für die Bereitstellung von Referenzsubstanzen und Proben.

Bei meinen Kollegen/innen möchte ich mich für die angenehme und freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe bedanken.

Meinen Lieben

1	EINFÜHRUNG.....	6
1.1	MYKOTOXINE	6
1.2	DEOXYNIVALENOL	6
1.2.1	Vorkommen	7
1.2.2	Toxizität.....	8
1.3	ZEARALENON.....	10
1.3.1	Vorkommen	10
1.3.2	Toxizität.....	11
1.4	GESETZGEBUNG.....	12
1.5	BESTEHENDE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON DON UND ZON.....	14
2	ZIELSETZUNG	21
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	22
3.1	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	22
3.1.1	Die Sol – Gel – Technologie	22
3.1.2	Einsatz von Sol – Gel immobilisierten Biomolekülen zur Probenvorbereitung	25
3.2	WEITERE METHODEN ZUR IMMOBILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN	33
3.3	HPLC	35
3.3.1	Theorie der Chromatographie.....	35
3.3.1.1	Der Retentionsvorgang	35
3.3.1.2	Das Chromatogramm und wichtige Parameter.....	36
3.3.1.3	Peakform und Peakverbreiterung	38
3.3.1.4	Chromatographische Auflösung.....	42
3.3.2	HPLC – Apparatur.....	43
3.3.2.1	HPLC – Pumpe	44
3.3.2.2	Injektor.....	45
3.3.2.3	Säulenofen	46
3.3.2.4	HPLC – Trennsäule	46
3.3.2.5	Detektoren.....	47
3.3.2.5.1	UV / vis – Detektor	47
3.3.2.5.2	Fluoreszenzdetektor.....	48
3.3.2.5.3	Massenspektrometrischer Detektor	50
3.3.2.5.3.1	Probeneinführung und Ionisation	51
3.3.2.5.3.2	Ionentrennung.....	53
3.3.2.5.3.3	Detektion	54
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1	HPLC	55
4.1.1	Bestimmung von DON.....	55

4.1.2	Bestimmung von ZON.....	57
4.1.3	Bestimmung von DON und ZON mittels LC / MS	59
4.2	VORUNTERSUCHUNGEN MIT DON – IMMUNAFFINITÄTSSÄULEN	62
4.2.1	Herstellung der DON – Immunaffinitätssäulen.....	62
4.2.2	Bestimmung der Durchbruchkapazität der DON – IAS.....	63
4.2.3	Retentionsmechanismus von DON	64
4.2.4	Bestimmung der Kreuzreaktivität.....	65
4.2.5	Optimierung der Operationsbedingungen.....	67
4.2.5.1	Wahl des Aufgabemediums.....	67
4.2.5.2	Einfluss des pH – Wertes des Aufgabemediums auf die Wiederfindung von DON	68
4.2.5.3	Wahl des Waschmediums	69
4.2.5.4	Wahl des Elutionsmittels und des Elutionsvolumens.....	69
4.2.5.5	Optimierung der Aufgabegeschwindigkeit.....	70
4.2.5.6	Einfluss der DON – Konzentration und des Aufgabevolumens auf die Wiederfindung von DON	71
4.2.5.7	In Standardversuchen optimierte Methode	72
4.2.5.8	Reproduzierbarkeit der Herstellung der DON – IAS	72
4.2.6	Anwendung der DON – IAS zur Aufarbeitung von Realproben	73
4.2.6.1	Optimierung der Aufgabegeschwindigkeit.....	74
4.2.6.2	Optimierung der Waschbedingungen.....	75
4.2.6.3	Optimierte Methode zur Aufarbeitung von Realproben	81
4.2.7	Anwendung der optimierten Methode auf Realproben.....	81
4.2.7.1	Aufarbeitung einer Weizenprobe	81
4.2.7.2	Aufarbeitung einer Maisprobe	83
4.2.7.3	Aufarbeitung einer Spaghettiprobe.....	84
4.2.7.4	Validierung der Methode mit einer zertifizierten Referenzprobe	86
4.2.7.5	Wiederverwendbarkeit und Stabilität der DON – Immunaffinitätssäulen	86
4.2.8	Aufarbeitung der Proben mittels kommerziell erhältlichen Immunaffinitätssäulen	90
4.2.8.1	Selektivität.....	90
4.2.8.2	Wiederverwendbarkeit der DONPREP – Säulen	92
4.2.9	Vergleich der Sol – Gel – IAS und der DONPREP – Säule	93
4.2.10	Vorversuche zur Kommerzialisierung von Sol – Gel – Säulen.....	93
4.2.10.1	Überprüfung der Bindungskapazität der DON – IAS in Anwesenheit von Matrix	94
4.2.11	Identifizierung von DON mittels LC / MS	95
4.3	VORUNTERSUCHUNGEN MIT ZON – IMMUNAFFINITÄTSSÄULEN.....	98
4.3.1	Verwendete Antikörper.....	98
4.3.2	Auswahl verwendbarer Materialien – Prüfung auf Adsorption von ZON.....	98
4.3.3	Untersuchung der Retention von ZON in den ZON – IAS.....	101
4.3.4	Bestimmung der Durchbruchkapazität der ZON – IAS	104
4.3.5	Bestimmung der Kreuzreaktivität.....	105
4.3.6	Optimierung der Operationsbedingungen.....	107
4.3.6.1	Wahl des geeigneten Elutionsmittels	107

4.3.6.2	Wahl eines geeigneten Aufgabemediums	110
4.3.6.3	Einfluss des pH – Wertes der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von ZON	111
4.3.6.4	Wahl eines geeigneten Waschmediums.....	113
4.3.6.5	Einfluss des Aufgabevolumens und der ZON – Konzentration auf die Wiederfindung von ZON 114	
4.3.6.6	Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von ZON	116
4.3.6.7	Batch zu Batch Reproduzierbarkeit	117
4.3.6.8	Intraday– und Interday Reproduzierbarkeit der Methode und Wiederverwendbarkeit der ZON – IAS	118
4.3.7	<i>Zusammenfassung der im Standardversuch optimierten Methode</i>	119
4.3.8	<i>Anwendung der ZON – Immunaффinitätssäulen zur Aufarbeitung von Realproben</i>	119
4.3.8.1	Extraktion von ZON aus Realproben	120
4.3.8.2	Aufarbeitung einer Maisprobe	120
4.3.8.3	Aufarbeitung einer Weizenprobe	122
4.3.8.4	Vergleich der Accelerated Solvent Extraction mit der Extraktion mit 60 % ACN am Schüttler 123	
4.3.8.5	Standardaddition für die Weizenprobe.....	127
4.3.9	<i>Identifizierung von ZON mittels LC / MS</i>	129
4.4	DON/ZON – IMMUNAFFINITÄTSSÄULEN.....	131
4.4.1	<i>Unterschiede zwischen den DON und ZON Antikörpern</i>	131
4.4.2	<i>Bindungskapazität der DON/ZON – Immunaффinitätssäule</i>	131
4.4.3	<i>Fraktionierte Elution</i>	132
4.4.4	<i>Reproduzierbarkeit der Methode</i>	133
4.4.5	<i>Versuche mit Realproben</i>	135
4.4.5.1	Vorversuche zur gleichzeitigen Extraktion von DON und ZON aus Realproben	135
4.4.5.2	Aufarbeiten einer Realprobe.....	136
4.4.5.3	Versuche zur Verbesserung der Wiederfindung von DON	137
4.4.5.3.1	Einfluss der ACN – Konzentration in der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von DON und ZON 137	
4.4.5.3.2	Einfluss der Extraktion mit MeOH auf die Wiederfindung von DON und ZON	138
4.4.5.3.3	Einfluss der aufgegebenen DON – Menge im Filtrat.....	141
4.4.5.4	Standardaddition mit einer nicht kontaminierten Weizenmehlprobe	142
4.4.6	<i>Wiederverwendbarkeit der DON/ZON – Immunaффinitätssäulen</i>	147
4.4.7	<i>Qualitative und quantitative Bestimmung von DON und ZON mittels LC / MS</i>	148
5	EXPERIMENTELLER TEIL	153
5.1	HPLC	153
5.1.1	<i>Chromatographische Bedingungen bei der Detektion von DON und ZON mittels LC / MS</i>	155
5.1.1.1	Einstellung der Ionenfalle zur Detektion von DON und ZON.....	156
5.1.2	<i>Herstellung von PBS (pH 7,6)</i>	157
5.1.3	<i>Standardlösungen für DON und eventuell mit den DON – Antikörpern kreuzreagierende Verbindungen</i>	157
5.1.4	<i>Standardlösungen für ZON und eventuell mit ZON – AK kreuzreagierende Verbindungen</i>	158

5.2	SOL – GEL IMMUNAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	160
5.2.1	Verwendete Antikörper.....	160
5.2.2	Herstellung der Sol – Gel – Säulen.....	161
5.2.2.1	Herstellung des Hydrolysats.....	161
5.2.2.2	Herstellung der IAS.....	161
5.2.3	Reinigung der gebrauchten DONPREP – Säulen	163
5.2.4	Lagerung, Konditionierung und Regenerierung der Immunaффinitätssäulen.....	163
5.2.5	Auswahl verwendbarer Materialien – Prüfung auf Adsorption von ZON.....	164
5.2.5.1	Glas – und Kunststoffsäulchen	164
5.2.5.2	Glas – und Kunststoffgefäße.....	164
5.2.6	Optimierung der Aufgabegeschwindigkeit	165
5.2.6.1	DON – Immunaффinitätssäulen	165
5.2.6.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	166
5.2.7	Einfluss der MeOH – Konzentration in der Waschlösung auf die Wiederfindung von ZON.....	166
5.2.8	Einfluss des Aufgabevolumens und der Aufgabekonzentration auf die Wiederfindung.....	167
5.2.8.1	DON – Immunaффinitätssäulen	167
5.2.8.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	168
5.2.9	Einfluss des Elutionsmittels auf die Wiederfindung	169
5.2.9.1	DON – Immunaффinitätssäule.....	169
5.2.9.2	ZON – Immunaффinitätssäule	170
5.2.9.3	Fraktionierte Elution bei der DON / ZON – Immunaффinitätssäule.....	170
5.2.10	Durchbruchskurven – Bestimmung der Säulenkapazität.....	171
5.2.10.1	DON – Immunaффinitätssäulen	171
5.2.10.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	172
5.2.10.3	DON / ZON – Immunaффinitätssäule	172
5.2.11	Einfluss des Aufgabemediums auf die Wiederfindung.....	173
5.2.11.1	DON – Immunaффinitätssäule.....	173
5.2.11.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	173
5.2.12	Einfluss des pH – Wertes der Aufgabelösung auf die Wiederfindung	174
5.2.12.1	DON – Immunaффinitätssäulen	174
5.2.12.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	175
5.2.13	Retentionsmechanismus in Sol – Gel Säulen.....	175
5.2.14	Bestimmung der Kreuzreaktivität in der DON – Immunaффinitätssäule.....	176
5.2.15	Bestimmung der Wiederfindung in den Immunaффinitätssäulen.....	177
5.2.15.1	DON – Immunaффinitätssäulen	177
5.2.15.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	177
5.2.15.3	DON/ZON – Immunaффinitätssäulen	178
5.3	AUFARBEITUNG VON REALPROBEN	179
5.3.1	Realproben.....	179
5.3.2	Extraktion von DON und ZON aus Realproben.....	179
5.3.2.1	Extraktion von DON	179
5.3.2.2	Extraktion von ZON	180
5.3.2.3	Extraktion von ZON mittels „Accelerated Solvent Extraction“	180

5.3.2.4	Aufreinigung von Realproben – mittels Festphasenextraktion	181
5.3.3	Überprüfung der Bindungskapazität von DON in Anwesenheit von Matrix	181
5.3.4	Einfluss der ACN – Konzentration im Probenextrakt auf die Wiederfindung von DON und ZON in DON/ZON – Immunaффinitätssäulen	182
5.3.5	Einfluss des Extraktionsmediums auf die Wiederfindung von DON und ZON.....	183
5.3.6	Optimierung des Waschmediums für Realproben	184
5.3.7	Optimierung des Waschvolumens für Realproben	185
5.3.8	Anwendbarkeit von Detergentien – Standardversuch	185
5.3.9	Anwendbarkeit von Detergentien – Test mit Matrix.....	186
5.3.10	Optimierte Methoden zur Bestimmung von DON und ZON in Realproben	187
5.3.10.1	DON – Immunaффinitätssäulen	187
5.3.10.2	ZON – Immunaффinitätssäulen.....	188
5.3.10.3	DON/ZON – Immunaффinitätssäulen	188
5.3.11	Standardaddition.....	189
5.3.11.1	DON – Immunaффinitätssäule.....	189
5.3.11.2	Standardaddition für ZON	190
5.3.11.3	DON/ZON – Immunaффinitätssäulen	191
5.3.12	Aufarbeitung der Realproben mit einer DONPREP – Säule.....	192
5.3.13	Wiederverwendbarkeit der DONPREP – Säule	193
5.3.14	Aufarbeitung der Realproben mit ZEARASTAR – Säulen	194
6	CHEMIKALIENVERZEICHNIS.....	195
7	GERÄTE – UND MATERIALVERZEICHNIS.....	197
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	200
9	ANHANG.....	202
9.1	ABKÜRZUNGEN.....	202
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	204
9.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	212
9.4	LITERATURVERZEICHNIS	214
9.5	AUFLISTUNG DER PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE, POSTER UND PREISE.....	218
9.5.1	Veröffentlichungen in peer – reviewed Journalen und Monographien.....	218
9.5.2	Vorträge	219
9.5.3	Poster	220
9.5.4	Preise	222
9.6	LEBENS LAUF.....	223
9.7	ABSTRACT	225

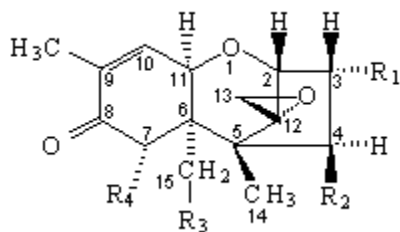
1 Einführung

1.1 *Mykotoxine*

Mykotoxine sind Sekundärmetabolite verschiedener Schimmelpilzarten, die daher zu den biogenen Kontaminanten gezählt werden. Aufgrund ihrer möglichen akuten und / oder chronischen Toxizität werden zum Schutz der Konsumenten Grenzwerte für Mykotoxine in Lebens – und Futtermitteln erstellt. Die toxische Wirkung kann entweder durch die Mykotoxine selbst oder durch ihre Metabolite verursacht werden. Es kann sich dabei um Karzinogenität, Hepato – und Nephrotoxizität, Immunsuppression oder reproduktive Toxizität handeln. Die gesundheitsschädigende Wirkung der Mykotoxine ist von der Art und dem Alter des betroffenen Individuums abhängig. Da sich die Einnahme von mit Mykotoxinen kontaminiertem Futter leistungs – und produktionsmindernd auf Tiere auswirken kann, können Kontaminationen mit Mykotoxinen große ökonomische Verluste verursachen.

1.2 *Deoxynivalenol*

Deoxynivalenol (DON) gehört zur Gruppe der Trichothecene, das sind Verbindungen, die als Gemeinsamkeit eine Sesquiterpen – Struktur mit einem Epoxidring aufweisen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur kann man die Trichothecene weiters unterteilen, wobei die wichtigsten Vertreter die A – und B – Trichothecene sind. DON gehört zu den B – Trichothecen, die im Unterschied zu den A – Trichothecen an der C₈ Position eine Carbonyl – Funktion aufweisen. Die Struktur von DON und anderen wichtigen B – Trichothecen ist in Abbildung 1 dargestellt.



Mykotoxin	Deoxy- nivalenol	Nivalenol	3-Acetyldeoxy- nivalenol	15-Acetyldeoxy- nivalenol	Fusarenon
R ₁	OH	OH	Acetyl	OH	OH
R ₂	H	OH	H	H	Acetyl
R ₃	OH	OH	OH	Acetyl	OH
R ₄	OH	OH	OH	OH	OH

Abbildung 1: Chemische Struktur von B – Trichothecen.

B – Trichothecene sind bis 120 °C stabil, bis 180 °C teilweise stabil und werden bei 210 °C innerhalb von ca. 35 min zersetzt.

Summenformel von DON: C₁₅H₂₀O₆

Mr [g/mol]: 296,3

Schmelzpunkt [°C]: 151–153

DON bildet farblose nadelförmige Kristalle, die in polaren Lösungsmitteln gut löslich sind. In organischen Lösungsmitteln ist es über längere Zeit stabil **[Shepherd und Gilbert, 1988]**, für eine Lagerung in gelöster Form über lange Zeitperioden haben sich am besten Ethylacetat und Acetonitril (ACN) als Lösungsmittel bewährt. **[JECFA 47, 2001]**

1.2.1 Vorkommen

DON wird hauptsächlich von *Fusarium graminearum* und *F. culmorum* produziert. Beide Pilzarten sind wichtige, weltweit auftretende Schadpilze, die Fußkrankheiten und Ährenfusariosen bei kleinkörnigem Getreide sowie Stängel – und Kolbenfäule bei Mais verursachen. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem

Auftreten von Fusariosen und der Kontamination mit DON beobachtet werden. Entscheidend für das Auftreten von Fusariosen ist die Feuchtigkeit während der Blütezeit des Getreides, wobei hier vor allem die Häufigkeit der Regenfälle, nicht jedoch ihre Stärke eine Rolle spielt. Optimale Bedingungen für das Wachstum von *F. graminearum* sind eine Temperatur von 25 °C und eine Wasseraktivität von 0,88. *F. culmorum* wächst bei 21 °C und einer Wasseraktivität von 0,87 optimal. (Die Wasseraktivität gibt die Menge des für die Pilze frei verfügbaren Wassers an. Sie ist definiert als Verhältnis des Wasserdampfdruckes über einem Material zum Wasserdampfdruck über reinem Wasser bei einer bestimmten Temperatur.) Diese Werte weisen darauf hin, dass beide Pilzarten in Nordamerika und Europa häufig vorkommen. DON findet man vor allem in Getreide wie Weizen, Gerste, Hafer, Roggen und Mais, seltener in Reis, Hirse und Triticale. Da DON thermisch relativ stabil ist, wird es auch in prozessiertem Getreide gefunden – wie z. B. Malz, Bier, Gebäck und Müsli. **[JECFA 47, 2001]**

1.2.2 Toxizität

DON inhibiert die DNA und RNA – Synthese und die Proteinsynthese auf RNA – Ebene. DON zeigt außerdem eine immunsuppressive Wirkung, es beeinflusst sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität, wodurch der Organismus anfälliger für Infektionskrankheiten wird. Auf Erythrocyten wirkt DON hämolytisch.

In toxikologischen Studien wurden der LD₅₀ – Wert (die Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben) und der LOEL – Wert (lowest observed effect level; die niedrigste Dosis, bei der eine Wirkung beobachtet wird) ermittelt. Die meisten Studien wurden an Schweinen durchgeführt, einige Studien aber auch an Mäusen, Hunden, Katzen Schafen und Pferden. In einer Studie, die 1987 von Forsell et al. an Mäusen durchgeführt wurde, betrug der LD₅₀ – Wert nach oraler Verabreichung von DON 77 mg / kg Körpergewicht. **[Forsell et al., 1987]**

Bei Schweinen rufen hohe Dosen von DON generell Erbrechen hervor, in niedrigeren Dosen reduziert DON das Wachstum und die Nahrungsaufnahme. **[Rotter et al., 1996], [Prelusky et al., 1997]**

In einer Studie von Pestka et al. wurde DON – hältiges Futter an drei Schweine mit einem Körpergewicht von 10 – 15 kg verabreicht. Bereits eine Dosis von 0,05 mg / kg Körpergewicht führte bei einem Tier zu Erbrechen. **[Pestka et al., 1987]** Im Jahr 1999 führten Hughes et al. eine ähnliche Studie an Hunden und Katzen durch. Der LOEL – Wert betrug bei Hunden 0,45 und bei Katzen 0,40 mg / kg Körpergewicht **[Hughes et al., 1999]**

Bei Menschen verursachen akute DON – Toxikosen Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Kopfweg, Schwindelanfälle und Fieber. **[JECFA 47, 2001]**

Einige epidemiologische Studien berichten über Ausbrüche von akuten DON – Toxikosen in Japan, China und Indien. In China kam es in der Zeit von 1961 bis 1985 zu 35 Ausbrüchen, insgesamt waren 7818 Personen betroffen. Im Jahr 1984 erkrankten 362 von 383 Personen, die verschimmelten Mais konsumiert hatten. Die DON – Konzentration im Mais betrug zwischen 3,8 und 93 mg / kg. **[JECFA 47, 2001]**

Todesfälle als Folge einer Mykotoxikose sind bis jetzt nicht gemeldet worden. Chronische Krankheiten wie Speiseröhrenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs und eine Form von Osteoarthritis werden in Zusammenhang mit einer Langzeitexposition gegenüber DON gebracht. In einer von Luo et al. im Jahr 1990 publizierten Studie wurde die DON – Belastung in Speisemais in zwei Regionen Chinas mit unterschiedlichen Inzidenzen von Speiseröhrenkrebs bestimmt und miteinander verglichen. In der Region mit der höheren Inzidenz an Speiseröhrenkrebs lag die DON – Konzentration zwischen 0,017 und 3,5 mg / kg Lebensmittel mit einem Mittelwert von 0,57 mg / kg Lebensmittel, in der anderen Region zwischen 0,011 und 0,61 mg / kg Lebensmittel mit einem Mittelwert von 0,099 mg / kg Lebensmittel. Diese Ergebnisse lassen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Konsumation von DON – belasteten Lebensmitteln und dem Auftreten von Speiseröhrenkrebs schließen. **[Luo et al., 1990]**

1.3 Zearalenon

Zearalenon (ZON) ist ein Vertreter von endokrin wirksamen Mykotoxinen mit einer nichtsteroiden Struktur (siehe Abbildung 2).

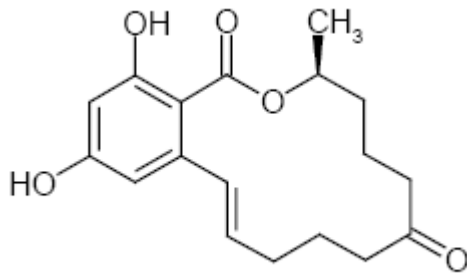


Abbildung 2: Chemische Struktur von Zearalenon.

ZON bildet weiße Kristalle aus und ist gut löslich in polaren organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril, Ethanol oder Aceton. In Wasser ist ZON unlöslich.

Summenformel von ZON: $C_{18}H_{22}O_5$

Mr [g/mol]: 318,4

Schmelzpunkt [°C]: 162–163

ZON ist lichtempfindlich, deshalb sollte es in dunklen Glasgefäßen bei – 20 °C gelagert werden. Zur Herstellung von Standardlösungen wird Acetonitril empfohlen. Diese Lösungen sind bei einer Lagerung bei 4 °C mindestens 12 Monate lang stabil.

[Josephs et al., 2003]

1.3.1 Vorkommen

Auf allen Kontinenten der Erde mit Ausnahme der Antarktis wurden bereits Belastungen von Lebens – und Futtermitteln mit ZON festgestellt. Im Jahr 1995 berichteten Yamashita et al. über eine ZON – Belastung von Getreide in Thailand, Indonesien und auf den Philippinen, **[Yamashita et al., 1995]** ein Jahr später verfassten Doko et al. einen Bericht über die ZON – Belastung von Lebens – und

Futtermitteln in Afrika **[Doko et al., 1996]**, und im Jahr 1997 wiesen Molto et al. eine ZON – Belastung von Lebens– und Futtermitteln in Südamerika nach. **[Molto et al., 1997]**

ZON wird als Sekundärmetabolit von vielen Vertretern der Gattung *Fusarium* produziert, z.B. von *F. graminearum*, *F. semirectum*, *F. culmorum* und *F. crookwellense*. Es wird häufig in Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Reis oder Hirse gefunden. **[Tanaka et al., 1988]** Die ZON – Konzentrationen schwanken sehr stark und sind von klimatischen Bedingungen abhängig. **[JECFA 44, 2000]**

1.3.2 Toxizität

Die akute Toxizität von ZON ist nicht sehr hoch. Hiddy et al. haben im Jahr 1977 LD₅₀ Werte für Mäuse, Ratten und Schweine publiziert. Bei oraler Aufnahme wurde für Ratten ein LD₅₀ Wert von > 4 000, für Mäuse > 20 000 und für Schweine > 5 000 mg / kg Körpergewicht ermittelt. **[Hidy et al., 1977]**

Kurzzeitstudien wurden an Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schweinen und Wiederkäuern durchgeführt. Da Schweine am empfindlichsten auf ZON reagieren, werden hier zwei Studien zitiert, die an Schweinen durchgeführt wurden:

Im Jahr 1990 verabreichten Rainey et al. einer Gruppe von zehn Ferkeln, die alle 70 Tage alt waren, zuerst zwei Wochen lang eine ZON – Diät mit 0,08 mg / kg Körpergewicht / Tag, und anschließend für entweder 45 oder 90 Tage eine ZON – Dosis von 0,06 mg / kg Körpergewicht / Tag. Bereits nach sieben Tagen wurden Schwellungen und Rötungen der Vulva beobachtet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten keine Unterschiede im Körpergewicht und in der Fettschichtdicke festgestellt werden. **[Rainey et al., 1990]**

Fünf Jahre später verabreichten Dacasto et al. einer Gruppe von trächtigen Säuen eine ZON – Dosis von 0,1 – 1 mg / kg Körpergewicht / Tag in einer Zeitperiode von 24 Tagen vor dem Wurf bis zum Wurf. Bei den meisten Ferkeln zeigten sich zwei bis drei Tage nach der Geburt Anzeichen von Mykotoxikosen, in wenigen Fällen waren sie schon bei der Geburt feststellbar. Es handelte sich dabei um Rötungen und Schwellungen der Vulva und Rötungen und Nekrosen am Schwanz. Die Säue zeigten keine Anzeichen von Hyperöstrogenismus. **[Dacasto et al., 1995]**

Langzeitstudien wurden an Mäusen und Ratten durchgeführt. Die Langzeitwirkung von ZON auf Ratten untersuchten 1982 Becci et al. Einer Gruppe von 50 männlichen und 50 weiblichen Ratten wurde ab einem Alter von 28 Tagen bis zum Alter von 104 Wochen ZON verabreicht. Die ZON Menge betrug am Anfang 0, 0,1, 1 bzw. 3 mg ZON / kg Körpergewicht / Tag und sie wurde wöchentlich an die Gewichtsveränderung der Tiere angepasst. Am Ende der Studie wurde bei Tieren beider Geschlechter, die mit einer ZON – Dosis von 3 mg / kg Körpergewicht / Tag gefüttert worden waren, eine signifikante Gewichtszunahme der Leber beobachtet. Bei weiblichen Tieren, denen die zwei höchsten ZON – Dosen verabreicht worden waren, wurde eine signifikante Gewichtszunahme der Gebärmutter festgestellt. Bei Ratten, denen eine höhere ZON – Dosis verabreicht worden war, wurden Veränderungen am Femur festgestellt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Krebsinzidenz und der ZON – Diät nachgewiesen werden. **[Becci et al., 1982]**

Im Jahr 2007 wurde ein Artikel von Morgavi und Riley veröffentlicht, der einen Überblick über Ausbrüche von Mykotoxikosen gibt, die der Konsumation von mit Fusarien kontaminiertem Getreide zugerechnet werden. Darin werden sowohl die von ZON als auch die von DON verursachten Mykotoxikosen behandelt. **[Morgavi und Riley, 2007]**

1.4 Gesetzgebung

Am 1.7.2005 trat eine neue Verordnung (Nr. 856/2005) der Europäischen Kommission als Ergänzung zur Verordnung Nr. 466/2001 zur Regelung der Fusarientoxine in Kraft. Die Verordnung Nr. 466/2001 fasst die Grenzwerte für eine Reihe von Lebensmittelkontaminanten zusammen. Die Verordnung Nr. 856/2005 enthält unter anderen einen TDI – Wert (tolerable daily intake, die Dosis einer Substanz, die ein Leben lang täglich über die Nahrung aufgenommen werden kann, ohne dass nach dem jetzigem Stand der Wissenschaft eine Schädigung hervorgerufen wird) für DON von 1 µg / kg Körpergewicht / Tag und ein temporärer TDI – Wert (t – TDI) für ZON von 0,2 µg / kg Körpergewicht / Tag.

In dieser Verordnung werden Getreide und Getreideprodukte, vor allem auf Weizen und Mais basierende, als Hauptquellen für Fusarientoxine betrachtet. Weiters wird in der Verordnung festgehalten, dass die Toxinbelastung von Erwachsenen meistens

unter dem TDI – Wert liegt, bei Kindern hingegen wird der TDI – Wert oft erreicht oder sogar überschritten. Eine Ausnahme bildet hier ZON, bei dem die tatsächliche Belastung üblicherweise weit unter dem TDI – Wert liegt. Es ist jedoch Vorsicht bei Kindern geboten und bei den Populationsgruppen, die in größerem Ausmaß Getreide und Getreideprodukte konsumieren. Getreide wird von Fusarien schon vor der Ernte befallen. Für den Befall sind klimatische Bedingungen in der gesamten Wachstumsperiode, vor allem aber in der Blütezeit entscheidend. Nicht minderwichtig ist aber auch die richtige Bodenbearbeitung gemäß „good agricultural practices“, wodurch sich das Risiko eines Fusariumbefalls minimieren lässt. Um die Gesundheit der Allgemeinheit zu schützen, wurden Grenzwerte für unverarbeitetes Getreide erstellt. Die Mykotoxinkonzentrationen im Getreide sollen vor und bei der Ernte so wie während der Lagerung kontrolliert werden, damit die Chargen, welche die Grenzwerte überschreiten, erst gar nicht in die Verarbeitungskette gelangen. Während des Getreidewachstums, der Ernte und der Lagerung sollen die Regeln der „good agricultural, harvest and storage practices“ befolgt werden.

Im Anhang dieser Regelung sind die Grenzwerte für die einzelnen Mykotoxine in diversen Produkten zusammengefasst (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2).

Tabelle 1: Grenzwerte für DON in Lebens – und Futtermitteln [EU – Verordnung Nr. 856/2005].

Produkt	Grenzwert für DON [μg / kg]
Unverarbeitetes Getreide außer Durum – Weizen, Hafer und Mais	1250
Unverarbeiteter Durum – Weizen, Hafer und Mais	1750
Mehl	750
Brot, Gebäck, Müsli	500
Nudeln (trocken)	750
Verarbeitetes Getreide – als Nahrung für Jugendliche, Kinder oder Säuglinge	200

Tabelle 2: Grenzwerte für ZON in Lebens – und Futtermitteln [EU – Verordnung Nr. 856/2005].

Produkt	Grenzwert für ZON [$\mu\text{g} / \text{kg}$]
Unverarbeitetes Getreide außer Mais	100
Unverarbeiteter Mais, Maismehl	200
Mehl außer Maismehl	75
Brot, Gebäck und Kekse	50
Snack und Müsli	50
Verarbeitetes Getreide – als Nahrung für Jugendliche, Kinder oder Säuglinge	20

Diese Regelung bezieht sich auf alle Produkte, die nach dem 1.7.2005 auf den Markt gebracht wurden und werden.

Die Arbeitsgruppe um van Egmond hat im Frühjahr 2007 eine Arbeit veröffentlicht, die einen Überblick über die europa – und weltweite Regulation von Mykotoxinen in Lebensmitteln schafft. **[van Egmond et al., 2007]**

1.5 Bestehende Methoden zur Bestimmung von DON und ZON

In der Tabelle 3 sind einige kürzlich publizierte Artikel zusammengefasst, welche die Probenaufarbeitung und Bestimmung von DON, die von ZON oder die beider Mykotoxine gleichzeitig beschreiben. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, möglichst verschiedene Matrices, Probenvorbereitungs – und Analysemethoden abzudecken.

Als Ausgangspunkt wurde das Jahr 2001 gewählt, in dem zwei Übersichtsartikel von Krška et al. erschienen sind, die den Stand der DON bzw. ZON Analytik zusammenfassen. Außer DON und ZON werden in diesen Publikationen auch noch andere A – und B – Trichothecene, HT – 2 und T – 2 Toxin behandelt. Es werden sowohl die Entwicklung quantitativer analytischer Methoden als auch die verschiedenen Möglichkeiten der Probenvorbereitung beschrieben. Weiters werden

die analytischen Kenngrößen der Methoden zusammengefasst. **[Krska und Josephs, 2001], [Krska et al., 2001]** Eine weitere Übersichtsarbeit über die Analytik von Mykotoxinen wurde im Jahr 2006 veröffentlicht, in der die Anwendbarkeit von Methoden zur Kontrolle von Lebens – und Futtermitteln auf Mykotoxine diskutiert wird. **[Biselli, 2006]**

Im Jahr 2003 wurde eine Arbeit von Razzazi – Fazeli et al. veröffentlicht, in der eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Nivalenol, Deoxynivalenol, 15 – Acetyldeoxynivalenol, 3 – Acetyldeoxynivalenol, Fusarenon – X und Deepoxynivalenol in Schweineurin und Mais präsentiert wird. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit einer MycoSep Säule. Zur Auftrennung und Detektion wurde eine LC / MS Apparatur mit einem APCI – Interface verwendet. Zur Berechnung der Wiederfindung wurde ein interner Standard (Dexamethason) zugesetzt. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 63,7 % und 102,3 %, die Bestimmungsgrenzen (LOQ_s) zwischen 25 und 150 µg / kg in beiden Matrices. **[Razzazi – Fazeli et al., 2003]**

Ryu et al. veröffentlichten 2003 die Ergebnisse einer Studie, in der sie die Stabilität von Zearalenon in wässrigen Pufferlösungen untersuchten. Es wurde die Konzentrationsabnahme von ZON in Abhängigkeit von der Temperatur und des pH – Werts mittels HPLC – FLD gemessen. Es wurde gezeigt, dass die ZON Konzentration mit steigender Temperatur abnimmt. Nach 30 Minuten bei 225 °C war ZON unabhängig vom pH – Wert vollständig zersetzt. Die ZON – Lösungen waren bei einem pH – Wert von 7 am stabilsten. **[Ryu et al., 2003]**

Im Jahr 2002 publizierten Pallaroni et al. eine Arbeit, in der sie die Entwicklung einer LC / MS (APCI) – Methode zur Detektion von DON und ZON vorgestellt haben. **[Pallaroni et al., 2002]**

Ebenfalls im Jahr 2002 haben Kotal und Radova eine Methode zur Bestimmung von DON in Mehl und Getreide publiziert. Zur Aufreinigung der Extrakte wurden kommerzielle Immunaффinitätssäulen verwendet. Die DON – Konzentration wurde entweder mittels HPLC / UV oder GC / ECD gemessen. Die Wiederfindungsraten von DON lagen zwischen 83 % und 96 %. Die Nachweisgrenze der HPLC / UV Methode lag bei 20 µg / kg. Die Richtigkeit der Methode wurde mit einer zertifizierten Referenzprobe bestätigt. **[Kotal und Radova, 2002]**

Eine Publikation von Pallaroni und von Holst erschien im Jahr 2003. In dieser Arbeit wurde eine Methode, basierend auf der Probenvorbereitung mittels ASE und

anschließender Messung von ZON mittels LC / MS präsentiert, wobei Zearalanon als interner Standard verwendet wurde. Die Nachweisgrenze für ZON betrug 5 µg / kg in Weizen und 4 µg / kg in Mais. Mit der entwickelten Methode wurden Wiederfindungen > 90 % erhalten. **[Pallaroni und von Holst, 2003, a)]**

Pallaroni und von Holst publizierten 2003 eine weitere Arbeit, in der sie unterschiedliche Methoden zur Extraktion von ZON aus Maisproben verglichen. Zur quantitativen Bestimmung wurde eine LC / MS – Apparatur mit einem ESI – Interface verwendet. Es wurden folgende Extraktionsmethoden getestet: Extraktion durch Rühren, Extraktion am Schüttler, Extraktion im Ultraschallbad, Accelerated solvent extraction (ASE) und eine mikrowellenunterstützte Extraktion. Bei allen Methoden wurde dieselbe Extraktionslösung verwendet (ACN – MeOH, (1:1, v / v)). Die mikrowellenunterstützte Extraktion stellte sich am effizientesten heraus. Die Nachweisgrenze betrug 4,5 µg / kg Probe. **[Pallaroni und von Holst, 2003, b)]**

Dall'Asta et al. haben im Jahr 2004 eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von A – und B – Trichothecenen mittels HPLC und Fluoreszenz – Detektion nach einer Derivatisierung mit Cumarin – 3 – carbonylchlorid entwickelt. Es wurden folgende Verbindungen bestimmt: Diacetoxyscirpenol, T – 2 Toxin, HT – 2 Toxin, Deoxynivalenol, Nivalenol, Fusarenon – X, 15 – Acetyldeoxynivalenol und 3 – Acetyldeoxynivalenol. Die Extraktion wurde mit einer Wasser – Acetonitril Mischung (20:80, v:v) unter Rühren durchgeführt, der Extrakt wurde mit einem MycoSep – Säulchen aufgereinigt. Cumarin – 3 – carbonylchlorid wurde selbst von der Arbeitsgruppe synthetisiert, die Derivatisierung erfolgte bei 80 °C für 60 Minuten. Die Nachweisgrenzen bewegten sich zwischen 0,2 und 1 µg / kg, die Wiederfindung für DON lag bei 89 %. **[Dall'Asta et al., 2004]**

2004 wurde eine Arbeit von El – Nezami et al. veröffentlicht, die sich mit der Bindung von ZON an die Oberfläche von Lactobacillus rhamnosus Stämmen GG befasst. Es wurde beobachtet, dass sowohl lebende als auch durch Hitze oder Säure abgetötete Bakterien ZON binden können. Weiters wurde gezeigt, dass hydrophobe Wechselwirkungen bei der ZON – Bindung eine Rolle spielen. **[El – Nezami et al., 2004]**

Häubl et al. haben im Jahr 2006 eine Arbeit veröffentlicht, in der sie die Eignung eines vollständig ¹³C – markierten internen Standards zur Bestimmung von DON mittels LC / MS / MS ohne Probenaufreinigung untersucht haben. Die Extrakte wurden vor der Injektion in das LC / MS / MS – System lediglich filtriert und

aufkonzentriert. Es wurde gezeigt, dass durch die Verwendung dieses Standards störende Matrixeffekte, die die Richtigkeit der Ergebnisse beeinflussen würden, weitgehend eliminiert werden können. Diese Beobachtung wurde durch die Analyse von unaufgereinigten Weizen – bzw. Maisproben bestätigt. Die Wiederfindung von DON lag bei $95 \pm 3 \%$ in Weizen und bei $99 \pm 3 \%$ in Mais. **[Häubl et al., 2006]**

Hartmann et al. haben 2007 eine Studie über die Quantifizierung von östrogen wirksamen Mykotoxinen im ng / l Bereich in aquatischen Umweltproben publiziert. Es wurden Zearalenon, α – und β – Zearalenol und α – und β – Zearalanol bestimmt. Als interne Standards wurden mit Deuterium markierte Resorcyclsäurelactone verwendet. Die Probenextrakte wurden mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Bei den Proben handelte es sich um Wasser aus einem Entwässerungssystem, Flusswasser und Abwasser. Die Wiederfindung für ZON lag zwischen 95 und 108 %, die Nachweisgrenze zwischen 0,5 und 2,1 ng / l. **[Hartmann et al., 2007]**

Schothorst und Jekel haben 2003 eine Arbeit über die Bestimmung von Trichothecen im Bier mittels GC – FID publiziert. Es wurden folgende Trichothecene analysiert: Deoxynivalenol, Nivalenol, 3 – Acetyldeoxynivalenol, Fusarenon X, T – Toxin, HT – 2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Neosolaniol. Von den 51 getesteten Bierproben waren nur 3 Proben mit DON belastet, die gefundenen Konzentrationen bewegten sich zwischen 26 und 41 $\mu\text{g} / \text{l}$. Außer DON wurden keine anderen Trichothecene gefunden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 25 $\mu\text{g} / \text{l}$. **[Schothorst und Jekel, 2003]**

Im Jahr 2004 wurde von Royer et al. eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Fusarientoxinen in Mais vorgestellt. Zur Extraktion wurde die ASE verwendet, die Messung der Toxine erfolgte mittels LC / MS / MS (APCI). Es wurden folgende Verbindungen untersucht: Deoxynivalenol, Fumonisin B1 und Zearalenon. Nach der Extraktion der Maisproben mittels ASE wurden die Extrakte mit einer Festphasensäule und anschließend mit einer MycoSep Säule aufgereinigt. Die Nachweisgrenze betrug für DON 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$, für Fumonisin B1 20 $\mu\text{g} / \text{kg}$ und für ZON 3 $\mu\text{g} / \text{kg}$. Die Wiederfindungen betrugen 70 % für DON, 90 % für Fumonisin B1 und 40 % für ZON. **[Royer et al., 2004]**

Milanez und Valente – Soares haben im Jahr 2006 eine Publikation über die Bestimmung von Trichothecen in Mais, der im Bezirk São Paulo in Brasilien geerntet worden war, veröffentlicht. Dabei wurden Deoxynivalenol, Nivalenol, Diacetoxyscirpenol und T – 2 und HT – 2 Toxine untersucht. Die Extrakte wurden mit

MycoSep Säulchen aufgereinigt, die Detektion erfolgte mittels GC – MS. Von den insgesamt 80 getesteten Proben waren 16 Proben mit Nivalenol belastet und 2 mit DON. Andere Toxine wurden nicht gefunden. Die Nachweisgrenze für DON lag bei 20 µg / kg. **[Milanez und Valente – Soares, 2006]**

Champeil et al. haben im Jahr 2004 eine Arbeit publiziert, in der sie den Einfluss der Probenahme auf die Bestimmung von Mykotoxinen in Weizenproben beschrieben. Es wurden DON und Nivalenol untersucht. Die Proben wurden mittels GC – MS analysiert, die Nachweisgrenze von DON lag bei 30 µg / kg. Es wurde festgestellt, dass die Ergebnisse von DON mit einer größeren Unsicherheit behaftet sind als die von Nivalenol. Weiters wurde gezeigt, dass durch Mahlen der Probe die Streuung der Ergebnisse zunimmt. Auch die Zeitspanne zwischen der Probenahme und der Analyse der Proben hat einen Einfluss auf die Ergebnisse. **[Champeil et al., 2004]**

Cavaliere et al. haben 2005 eine Methode zur Bestimmung von Fusarientoxinen in Getreidemehl mittels LC / MS / MS vorgestellt. Mit dieser Methode können in einem Lauf acht verschiedene Trichothecene, unter ihnen auch DON, weiters drei Fumonisine, Zearalenon und α – Zearalenol bestimmt werden. Die Proben wurden mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Zur Auftrennung wurde eine C – 18 Säule eingesetzt. Die Nachweisgrenzen bewegten sich zwischen 2 und 40 µg / kg. Mit dieser Methode wurden hohe Wiederfindungen (81 – 104 %) mit Standardabweichungen zwischen 4 und 11 % erzielt. **[Cavaliere et al., 2005]**

Im Jahr 2006 ist eine Arbeit von Klötzel et al. erschienen, in der eine Methode zur Bestimmung von A – und B – Trichothecenen in Getreide und in Lebensmitteln vorgestellt wurde. Es wurden ZON und 12 A – und B – Trichothecene, unter anderen auch DON, untersucht. Die Probenextrakte wurden mittels einer Festphasensäule aufgereinigt, die Eluate mittels LC / MS / MS analysiert. Die Nachweisgrenzen in Weizen bewegten sich zwischen 0,3 und 5,0 µg / kg. Die Wiederfindungen lagen im Bereich von 65 bis 104 %, mit relativen Standardabweichungen von 2,7 bis 20,0 %. **[Klötzel et al., 2006]**

In der Tabelle 3 sind die oben erwähnten Arbeiten zusammengefasst.

Tabelle 3: Aktuelle Studien über die Bestimmung von DON und ZON.

Autor, Jahr	Analyt	Probe	Probenaufreinigung	Trennung	Detektion	Nachweisgrenze
Razzazi – Fazeli et al., 2003	DON	Schweineurin, Mais	MycoSep Säule	HPLC	APCI – MS	Urin: 25 ng / ml Mais: 50 µg / kg
Ryu et al., 2003	ZON	Wässrige Pufferlösungen	Filtration	HPLC	FLD	keine Angaben
Pallaroni et al., 2002	DON, ZON	Standardlösungen	keine	HPLC	APCI – MS	keine Angaben
Kotal und Radova, 2002	DON	Getreide, Lebensmittel	IAS	HPLC bzw. GC	UV bzw. ECD	20 µg / kg
Pallaroni, von Holst, 2003 a)	ZON	Weizen, Mais	keine	HPLC	ESI – MS	Weizen : 5 µg / kg Mais: 4 µg / kg
Pallaroni, von Holst, 2003 b)	ZON	Mais	keine	HPLC	ESI – MS	4,5 µg / kg
Dall'Asta et al., 2004	DON	Weizen	MycoSep Säule	HPLC	LC – FLD	0,4 µg / kg
Ei – Nezami et al., 2004	ZON	Standardlösung	keine	HPLC	FLD	keine Angaben
Häubl et al., 2005	DON	Mais, Weizen	keine	HPLC	ESI – MS/MS	keine Angaben
Hartmann et al., 2007	DON	Wasserproben	SPE	HPLC	ESI – MS/MS	0,5 – 2,1 ng / l

Autor, Jahr	Analyt	Probe	Probenaufreinigung	Trennung	Detektion	Nachweisgrenze
Schothorst und Jekel, 2003	DON	Bier	SPE	GC	FID	25 µg / l
Royer et al., 2004	DON, ZON	Mais	ASE	HPLC	APCI – MS/MS	DON: 10 µg / kg ZON: 3 µg / kg
Milanez, Valente – Soares, 2006	DON	Mais	SPE	GC	EI – MS	20 µg / kg
Champeil et al., 2004	DON	Getreide	keine	GC	MS	30 µg / kg
Cavaliere et al., 2005	DON, ZON	Maismehl	SPE	HPLC	ESI – MS/MS	DON : 40 µg / kg ZON : 10 µg / kg
Klötzel et al., 2006	DON, ZON	Getreide, Lebensmittel	SPE	HPLC	ESI – MS/MS	0,3 – 5,0 µg / kg

2 Zielsetzung

Mykotoxine gehören zu den mikrobiologischen Kontaminanten von Lebens – und Futtermitteln, die diverse gesundheitliche Schäden hervorrufen können. Um die Gesundheit von Mensch und Tier zu schützen, wurden Richtlinien aufgestellt, die die höchstzulässigen Konzentrationen der Mykotoxine in Lebens – und Futtermitteln regeln.

Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sind die häufigsten Mykotoxine in unseren Breiten. Durch die strengen Reglements hat ihre Bestimmung in Lebens – und Futtermitteln an Wichtigkeit gewonnen. Erfahrungsgemäß ist die Probenvorbereitung ein kritischer Schritt in der Analytik solch komplizierter Matrices wie Lebens – und Futtermittel. Deswegen werden effiziente und kostengünstige Methoden zur Probenvorbereitung benötigt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten neue Immunaффinitätssäulen (IAS) auf Sol – Gel – Basis zur Probenvorbereitung von mit DON und ZON belasteten Proben entwickelt werden. Konkret sollte es anfangs ein Säulentyp zur Aufarbeitung jeweils eines der beiden Analyte sein, in weiterer Folge sollte dann eine IAS zur Aufarbeitung von Proben, die mit beiden Mykotoxinen belastet sind, entwickelt werden. Diese IAS sollten mit kommerziell erhältlichen Immunaффinitätssäulen in ihrer Leistung vergleichbar sein, sowohl was die Matrixabtrennung betrifft als auch in ihrer Wiederfindung und Reproduzierbarkeit. Zuerst sollten alle Parameter mit Standardlösungen optimiert werden, danach sollte die Methode an die Besonderheiten der Probenmatrix angepasst werden. Als weiterer Punkt war abzuklären, ob die Säulen wieder verwendbar sind. Zur Auftrennung und Messung beider Analyte sollte eine HPLC – Apparatur mit einem geeigneten Detektor verwendet werden, und die entsprechenden HPLC – Methoden entwickelt werden. Mittels LC / MS sollte anschließend die Identifizierung beider Mykotoxine bestätigt werden, was wiederum eine Entwicklung von LC – MC Methoden zur qualitativen Analyse von DON und ZON erforderlich machte.

3 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel sollen Grundlagen der Affinitätschromatographie, der Sol – Gel – Technologie und der angewendeten chromatographischen Messmethoden kurz erläutert werden.

3.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie, auch bioselektive Adsorptionschromatographie genannt, ist eine besondere Form der Wechselwirkungschromatographie, bei der die Eigenschaften von Biomolekülen zu Nutze gemacht werden. Zueinander passende Partnermoleküle bilden miteinander mehr oder weniger stabile Komplexe. Bei den Partnermolekülen kann es sich z.B. um Antigen und Antikörper, Substrat und Enzym oder Hormon und Rezeptor handeln. Einer der Bindungspartner wird in einer geeigneten Weise an eine Trägermatrix fixiert, z.B. über ein Spacermolekül. So gebildete Affinitätsliganden sind hochwirksam und halten ihre Partnermoleküle aus der flüssigen Phase fest. Diese Wechselwirkung ist sehr selektiv, und restliche Probenbestandteile, die keine oder eine geringe Affinität besitzen, werden so effektiv abgetrennt. Die gebildeten Komplexe lassen sich durch Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase, durch pH – Änderung oder mittels geeigneter kompetitiver Moleküle dissoziieren. **[Doerffel et al., 1994]**

3.1.1 Die Sol – Gel – Technologie

Die Sol – Gel – Methode ist bereits seit einem Jahrhundert bekannt. Die erste Arbeit, in der diese Methode zur Immobilisierung von Enzymen verwendet wurde, stammt aus dem Jahr 1955. **[Dickey, 1955]** Danach wurde auf diesem Gebiet jahrzehntelang nur wenig publiziert, erst Anfang der 90er Jahre wurde diese Methode wiederentdeckt. 1992 veröffentlichten Ellerby et al. eine Arbeit, in der zur Immobilisierung von Enzymen Tetramethylorthosilikat als Ausgangssubstanz verwendet wurde. **[Ellerby et al., 1992]** Seit diesem Zeitpunkt wurden einige

Arbeiten publiziert, in denen die Anwendung der Sol – Gel – Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen beschrieben wurde.

Es wurden unterschiedlichste Methoden zur Herstellung des Sol – Gel – Glases entwickelt. Alle Methoden haben jedoch einige Merkmale gemeinsam: Als erster Schritt erfolgt die Hydrolyse der Ausgangssubstanz. Sie kann entweder sauer oder basisch katalysiert werden. Als Ausgangssubstanz werden meistens Alkoxysilane verwendet. Während der Hydrolyse wird ein Sol gebildet, eine wässrige Suspension kolloider Partikel. Die Hydrolyseprodukte kondensieren und es entsteht, bei gleichzeitigem Viskositätsanstieg, ein Gel. Die Kondensation schreitet fort, das Gel „altert“ und Lösungsmittelmoleküle werden kontinuierlich freigesetzt. Dies lässt sich durch eine Gewichtsabnahme des Gels mitverfolgen. Während der Alterung ändert sich die Porengröße. Je weiter die Kondensation fortschreitet, umso kleiner ist die Porengröße des Gels.

Wenn die Sol – Gel – Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen verwendet werden soll, setzt man dem Hydrolysat die zu immobilisierenden Moleküle zu. Die Biomoleküle werden im weiteren Verlauf der Kondensation in den Poren des Gels eingeschlossen.

In der Abbildung 3 sind die 5 Schritte der Herstellung einer Sol – Gel – Immunaффinitätssäule dargestellt.

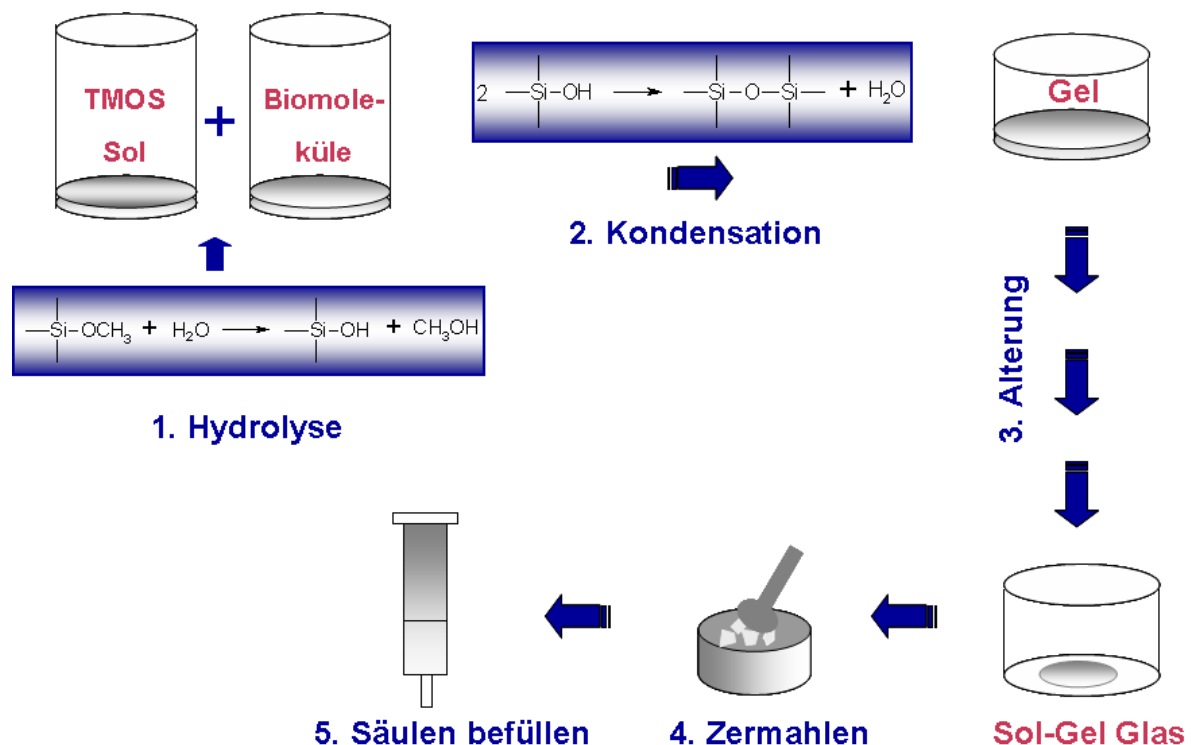


Abbildung 3: Schema der Herstellung von Sol – Gel – Immunaффinitätssäulen.

Die Vorteile der Sol – Gel – Methode liegen vor allem in der schonenden Immobilisierung von biologisch aktiven Substanzen (Verlauf bei Raumtemperatur und milden chemischen Bedingungen), sowie in der Möglichkeit, die Porengröße zu steuern, so dass der Analyt hineindiffundieren kann, das Protein aber nicht herausgespült werden kann. Im Jahre 1995 wurde von Zühlke et al. eine Studie veröffentlicht, in der die optimale Porengröße beim Einschluss von Antikörpern (mit einem Molekulargewicht von 150 kDa) nach einem Gewichtsverlust von 50 % erreicht wurde. **[Zühlke et al., 1995]** Die Immobilisierung von Biomolekülen erhöht zudem ihre Resistenz gegenüber einer thermischen und chemischen Denaturierung. Die immobilisierten Biomoleküle sind außerdem gegenüber einem mikrobiellen Abbau stabil, da Bakterien aufgrund ihrer Größe in die engen Poren des Sol – Gel – Glases nicht hineingelangen. Das Silikatgel hat günstige optische Eigenschaften, seine UV – Transparenz eröffnet die Möglichkeit, es auch als Teil eines optischen Sensors anzuwenden **[Gill und Ballesteros, 2000]**. Weiters ist diese Methode kostengünstig und zeitsparend.

3.1.2 Einsatz von Sol – Gel immobilisierten Biomolekülen zur Probenvorbereitung

Kürzlich ist ein Review – Artikel von Cichna – Markl über den Einsatz von Sol – Gel immobilisierten Biomolekülen zur Probenvorbereitung erschienen. In diesem wird die jüngste Entwicklung auf diesem Gebiet zusammengefasst. **[Cichna – Markl, 2006]**

Im Jahr 1997 wurde eine Arbeit von Cichna et al. publiziert, in der polyklonale Pyren – Antikörper mittels der Sol – Gel – Methode immobilisiert und das Sol – Gel – Glas in Säulen gepackt wurde. 1 g Sol – Gel – Glas enthielt 2 mg Antikörper. Die Säulen waren stabil und es kam zu keinem Säulenbluten. Es erfolgte eine spezifische

Ag – Ak Bindung, und die Säulen waren wieder verwendbar. Die Durchbruchskapazität betrug 78 ng Pyren / g Gel, bzw. 38 ng Pyren / mg Antikörper. Es wurde gezeigt, dass eine längere Lagerung der Säulen in PBS eine unspezifische Bindung von Pyren begünstigt. **[Cichna et al., 1997 (a)]**

Im Jahr 1997 wurde noch eine zweite Arbeit von Cichna et al. publiziert, in der die Optimierung der Selektivität der Pyren – IAS beschrieben wird. Durch das Waschen der Säule mit höhermolekularen Polymerlösungen wurde die unspezifische Adsorption von PAH's unterbunden, mit oberflächenaktiven Verbindungen wurden störende Matrixkomponenten in Micellen eingeschlossen und aus der Säule gespült. **[Cichna, et al., 1997 (b)]**

Bronshtein et al. haben im Jahr 2000 eine Anwendung der Sol – Gel – basierten Immunaффinitätschromatographie zur Isolierung von nitroaromatischen Verbindungen veröffentlicht. In der Sol – Gel – Matrix wurden Dinitrophenyl – Antikörper immobilisiert. Immobilisiert wurde entweder das vollständige Antiserum, oder aus diesem Antiserum isolierte Antikörper. Die Bindungseigenschaften der Sol – Gel – Säulen wurden mit 2,4 – Dinitrophenylhydrazin getestet und optimiert. Es wurde gezeigt, dass ein Zusatz von 10 % Polyethylenglykol bei der Herstellung der Sol – Gel – Matrix die unspezifischen Bindungen von nitroaromatischen Verbindungen inhibiert. Die Bindungskapazität der Säulen, bei denen das Antiserum zur Immobilisierung verwendet worden war, und der Säulen, die die isolierten Antikörper enthielten, waren gleich. Säulenbluten wurde nur bei extremen pH – Werten oder bei Elution mit organischen Lösungsmitteln beobachtet. **[Bronshtein et al., 2000]**

Ebenfalls im Jahr 2000 haben Spitzer et al. eine Arbeit über die Bestimmung von 1 – Nitropyren in Gewürzen veröffentlicht. Die Extraktion erfolgte mittels Acetonitril, danach wurde eine Größenausschlußchromatographie und anschließend eine Sol – Gel – Immunaффinitätschromatographie durchgeführt. Nach der Auftrennung in der analytischen Säule erfolgte eine katalytische online – Reduktion zum entsprechenden Amin und die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor. In den Gewürzen wurden 1 – Nitropyrenkonzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1,4 µg / kg gefunden. **[Spitzer et al., 2000]**

Im Jahr 2001 haben Cichna et al. eine Arbeit veröffentlicht, in der die online – Kopplung einer Sol – Gel – Säule mit dem HPLC – System beschrieben wird. Das analytische System bestand aus einer Sol – Gel – Säule mit immobilisierten Pyren – Antikörpern, einer Vorsäule, einer analytischen Säule, drei Sechswegventilen, zwei Pumpen und einem Fluoreszenzdetektor. Es wurde gezeigt, dass die Sol – Gel – Säule dem Druck der HPLC standhielt und sie mindestens 30mal verwendet werden konnte. Mit der optimierten Methode wurde eine Wasserprobe aufgearbeitet, die Nachweisgrenze von Pyren lag bei 15 pg / ml. **[Cichna et al., 2001]**

Stalikas et al. haben im Jahr 2002 eine Arbeit über die Bestimmung von s – Triazinen in Wasser und Bodenproben veröffentlicht. Die Proben wurden mittels einer Sol – Gel – Immunaффinitätssäule aufgereinigt, in der monoklonale Triazin – Antikörper immobilisiert waren. Die Extrakte wurden mittels GC mit einem Stickstoff – Phosphor – Detektor analysiert. Aufgrund der hohen Kreuzreaktivitäten der Antikörper konnten folgende s – Triazin – Herbizide mit der Sol – Gel – Säule gleichzeitig isoliert werden: Atrazin, Propazin, Terbutylazin, Cyanazin und Desethyl Atrazin. Die Elution der Triazine von der Immunaффinitätssäule erfolgte mit einer Pufferlösung mit einem pH – Wert von 2,5. Mit dieser Methode wurden Wasser – und Bodenproben aufgearbeitet. Parallel dazu wurden diese Proben auch noch mittels Flüssig / flüssig – Extraktion und mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. Die nach den drei Aufarbeitungsmethoden erhaltenen Chromatogramme wurden miteinander verglichen. Nach der Aufarbeitung mit Sol – Gel Säulen befanden sich keine Matrixkomponenten im Eluat, eine unspezifische Adsorption von Huminsäuren wurde nicht beobachtet. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,02 und 0,1 µg / l. Die Sol – Gel – Säulen waren wieder verwendbar. **[Stalikas et al., 2002]**

Ebenfalls im Jahr 2002 wurde eine Arbeit von Yang et al. publiziert. Sie befasste sich mit der Entwicklung eines Fließinjektions – Fluoreszenz – Immunoassays für

Gentamicin unter Verwendung eines Sol – Gel – derivatisierten mesoporösen Biomaterials. Gentamicin – Antikörper wurden in einer Sol – Gel – Matrix mit Tetramethoxysilan als Monomer und Polyethylenglycol immobilisiert. Dieses Material wurde anschließend in Säulchen gefüllt und eine Methode zur Aufarbeitung von Gentamicin entwickelt. Es wurde eine geringe unspezifische Adsorption von Gentamicin an der Sol – Gel – Matrix beobachtet. Auch bei der Anwendung von organischen Lösungsmitteln wurde kein Säulenbluten festgestellt. Der Immunoassay basierte auf einer Konkurrenzreaktion zwischen Gentamicin und Fluorescein – isocyanat – markiertem Gentamicin um die Bindungsstellen an den immobilisierten Antikörpern. Nach dem Assay konnte die Säule regeneriert und bis zu 20 mal wieder verwendet werden. **[Yang et al., 2002]**

Im Jahr 2005 haben Braunrath und Cichna eine Methode zur Probenvorbereitung zur Bestimmung von Bisphenol A (BPA) in konservierten Lebensmitteln vorgestellt. In Voruntersuchungen wurde geeignetes Labormaterial ausgewählt, aus dem BPA nicht ausblutet. Danach wurden in einer Sol – Gel – Säule polyklonale BPA – Antikörper immobilisiert. Zuerst wurde der Retentionsmechanismus von BPA in den Säulen untersucht, danach wurden die einzelnen Arbeitsschritte optimiert, und anschließend wurden die Bindungskapazität, die Wiederfindung und die Kreuzreaktivität bestimmt. Mit der optimierten Methode wurden konservierte Lebensmittel aufgearbeitet. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,1 und 4,3 ng / g, die Wiederfindungen zwischen 53 % und 75 %. **[Braunrath und Cichna, 2005]**

Hodgson et al. haben im Jahr 2005 eine Arbeit über eine monolithische meso / makroporöse Kapillarsäule zur Immunextraktion publiziert. Das Säulenmaterial wurde aus einer Mischung von Diglycerylsilan, Polyethylenglycol und Fluorescein – Antikörpern hergestellt. Die Dissoziationskonstante des Antigen – Antikörperkomplexes und die Bindungskapazität des Säulenmaterials wurden bestimmt. Es wurde ein Ausbluten der Antikörper aus den Makroporen beobachtet. Weiters wurde gezeigt, dass sich die Antikörper in der Sol – Gel – Matrix in nativer Form befinden. Die entwickelte Methode wurde zur online – Extraktion und Anreicherung von Fluorescein angewendet. **[Hodgson et al., 2005]**

Ebenfalls im Jahr 2005 haben Braunrath et al. eine Arbeit über die Bestimmung von BPA in konservierten Lebensmitteln veröffentlicht. Es wurden Früchte, Gemüse, fetthaltige Lebensmittel und Getränke in Dosen untersucht. Zur Probenvorbereitung wurde eine Sol – Gel – Immunaффinitätssäule mit immobilisierten BPA – Antikörpern

verwendet, die Analyse erfolgte mittels HPLC – FLD. Mit einer Ausnahme wurde in allen untersuchten Proben BPA gefunden. Die Konzentrationen bewegten sich zwischen 0,1 ng / ml (Zitronenlimonade) und 38 ng / g (Suppe aus Thailand). Die gefundenen Konzentrationen lagen weit unter dem von der EU – Kommission im Jahr 2004 festgelegten Migrationsgrenzwert von BPA in konservierten Lebensmitteln (0.6 mg / kg). Die Wiederfindung von BPA lag zwischen 27 % (im konservierten Gulasch) und 103 % (in der Zitronenlimonade). **[Braunrath et al., 2005]**

Im Jahr 2005 haben Hrebicek und Cichna eine Methode zur Probenaufreinigung zur Bestimmung von 5 – Methyltetrahydrofolat in Milch publiziert. Sie haben in einer Sol – Gel – Säule β – Lactoglobulin immobilisiert. β – Lactoglobulin ist ein Milchprotein, welches viele hydrophobe Verbindungen binden kann, so auch 5 – Methyltetrahydrofolat. Es wurde der Bindungsmechanismus untersucht und die Bindungskapazität bestimmt. Weiters wurden die einzelnen Arbeitsschritte optimiert und mit der optimierten Methode Milchproben aufgearbeitet. Die Konzentration von 5 – Methyltetrahydrofolat variierte im Bereich von 31 bis 70 ng / ml, die Nachweisgrenze betrug 0,3 ng / ml. **[Hrebicek und Cichna – Markl, 2005]**

2006 haben Zhang et al. eine Publikation veröffentlicht, die sich mit der online – Kopplung einer Immunaффinitätssäule mit immobilisierten Diuron – Antikörpern mit einem LC / MS / MS – System zur Analyse von Diuron im Abwasser aus Kläranlagen befasst. Die Immunaффinitätssäule war auf Sol – Gel – Basis und diente zur Entfernung von Matrixkomponenten und der Anreicherung von Diuron. Eine zweite monolithische Säule wurde als analytische Säule verwendet. Die Methode wurde optimiert und zum Aufarbeiten von Abwasserproben angewendet. Die Wiederfindungsraten lagen bei 90 %, mit einer relativen Standardabweichung von 6 %. Die Bestimmungsgrenze betrug 1,0 ng / l. **[Zhang et al., 2006]**

Im Jahr 2006 wurden die Ergebnisse meiner Diplomarbeit **[Brenn – Struckhofova, 2005]** publiziert. Die Arbeit befasste sich mit der Bestimmung von BPA in Wein. Es wurden insgesamt 59 Weinproben aufgearbeitet, 46 Weißwein – und 14 Rotweinproben. Die Weine waren entweder in Fässern aus Holz, Kunststoff bzw. Edelstahl gelagert, oder bereits in Flaschen oder Tetrapac abgefüllt worden. Bei den Weinen, die in Glasflaschen gefüllt worden waren, wurde auch auf das Material des Flaschenverschlusses geachtet. Zur Aufreinigung der Proben wurde eine Sol – Gel – Säule mit immobilisierten BPA – Antikörpern verwendet. Die Analyse erfolgte mittels HPLC / FLD. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng / ml. In 13 Proben wurde kein BPA

gefunden, der Mittelwert der BPA – Konzentration in den restlichen Proben betrug 0,58 ng / ml, der Median 0,4 ng / ml. **[Brenn – Struckhofova und Cichna – Markl, 2006]**

Ebenfalls im Jahr 2006 wurde eine Arbeit von Degelmann et al. veröffentlicht, in der die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Sulfonylharnstoff – Herbiziden in Wasser und Lebensmittelproben beschrieben wird. In dem Sol – Gel – Glas wurden Sulfonylharnstoff – Antikörper immobilisiert. Es wurden zwei Säulentypen verwendet. Der erste Typ enthielt gemahlenes Sol – Gel – Glas, in den zweiten Typ wurden mit Sol – Gel – Glas überzogene poröse Silikapartikel eingefüllt. Die Analyse der Sulfonylharnstoff – Herbizide erfolgte mittels LC (UV) – MS / MS. Die Operationsbedingungen wurden optimiert und die Bindungskapazität für 30 Verbindungen bestimmt. Bei 16 ausgesuchten Verbindungen wurden die Wiederfindungen in Wasser bestimmt, bei 13 von diesen waren sie höher als 80 %. In Tomaten wurden 10 Verbindungen bestimmt, die Wiederfindungen lagen bei allen über 75 % **[Degelmann et al., 2006]**

Im Jahr 2007 haben Stidl und Cichna – Markl eine Arbeit über die Bestimmung von Chloramphenicol in Shrimps veröffentlicht. Es wurden Chloramphenicol – Antikörper in einer Sol – Gel – Säule immobilisiert. Der Retentionsmechanismus und die Kreuzreaktivität in der Säule wurden untersucht. Die Methodenparameter wurden optimiert und mit der optimierten Methode Shrimpsproben aufgearbeitet. Die Nachweisgrenze der Methode lag bei 1,8 ng / g. Die Wiederfindung von Chloramphenicol war 68 % mit einer relativen Standardabweichung von 4 %. Mit einer Säule konnten bis zu 12 Proben aufgearbeitet werden. **[Stidl und Cichna – Markl, 2007]**

Ebenfalls im Jahr 2007 wurde von Podlipna und Cichna – Markl eine Publikation veröffentlicht, in der die Bestimmung von BPA in konserviertem Fisch beschrieben ist. Zur Probenvorbereitung wurde eine Sol – Gel – Immunaффinitätssäule mit immobilisierten BPA – Antikörpern verwendet, die Analyse erfolgte mittels HPLC – FLD. Es wurden 19 Proben analysiert (Thunfische, Sardinen und Makrelen). Bei jeder Probe wurde sowohl das Fleisch als auch die Flüssigkeit, in der der Fisch konserviert wurde, separat analysiert. Die Nachweisgrenzen reichten von 0,2 ng / g (Sardinen) bis 1,8 ng / g (Öl). Im Makrelenfleisch wurden geringe BPA – Konzentrationen gefunden (2 – 4 ng / g). Die höchste BPA – Konzentration wurde in einer Thunfischprobe gefunden (59 ng / g). Die BPA Konzentrationen im Öl waren

signifikant höher als im Saft. Alle gefundenen Konzentrationen lagen weit unter dem von der EU – Kommission im Jahre 2004 festgelegten Migrationsgrenzwert von BPA in konservierten Lebensmitteln (0,6 mg / kg). **[Podlipna und Cichna – Markl, 2007]**

Eine Publikation von Schöringhumer und Cichna – Markl, die ebenfalls 2007 erschienen ist, beschreibt die Bestimmung von BPA in Urin. Es wurde sowohl BPA in freier Form als auch das gesamte BPA analysiert. Zur Bestimmung von freiem BPA wurde eine Sol – Gel – Immunaффinitätssäule mit immobilisierten BPA – Antikörpern verwendet. Zur Bestimmung des gesamten BPA Gehalts wurde der Sol – Gel – Immunaффinitätssäule eine Sol – Gel – Säule vorgeschaltet, in der die Enzyme Glucuronidase und Arylsulfatase immobilisiert waren. Die optimierte Methode wurde zur Aufarbeitung von Urinproben von gesunden Erwachsenen und Dialysepatienten angewendet. Dabei wurde eine Wiederfindung von 78 % mit einer Standardabweichung von 3,4 % erzielt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,2 ng / ml.

[Schöringhumer und Cichna – Markl, 2007]

Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die beschriebenen Publikationen.

Tabelle 4: Einsatz von Sol – Gel immobilisierten Biomolekülen zur Probenvorbereitung.

Autor, Jahr	Immobilisiertes Biomolekül	Ziel
Cichna et al., 1997 (a)	Pyren – AK	Herstellung und Charakterisierung der IAS
Cichna – Markl et al., 1997 (b)	Pyren – AK	Optimierung der Selektivität der IAS
Bronshtein et al., 2000	Dinitrophenyl – AK	Herstellung, Charakterisierung und Optimierung der IAS
Spitzer et al., 2000	1 – Nitropyren – AK	Bestimmung von 1 – Nitropyren in Kräutern
Cichna et al., 2001	Pyren – AK	Online Kopplung der IAS mit der HPLC
Stalikas et al., 2002	Atrazin – AK	Entwicklung einer Methode zur Probenvorbereitung zur Bestimmung von s – Triazinen in Wasserproben und Bodenextrakten
Yang et al., 2002	Gentamicin – AK	Entwicklung eines Fließinjektions – Immunoassay – Systems zur Bestimmung von Gentamicin
Braunrath und Cichna, 2005	BPA – AK	Entwicklung einer Methode zur Probenvorbereitung zur Bestimmung von Bisphenol A in konservierten Früchten und Gemüse
Hodgson et al., 2005	Fluorescein – AK	IAS zur Immunextraktion, online gekoppelt mit einem Laser – induzierten Fluoreszenzdetektor
Braunrath et al., 2005	BPA – AK	Bestimmung von BPA in konservierten Lebensmitteln
Hrebicek und Cichna – Markl, 2005	β – Lactoglobulin	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von 5 – Methyl – tetrahydrofolat in Milch

Autor, Jahr	Immobilisiertes Biomolekül	Ziel
Zhang et al., 2006	Diuron – AK	IAS – LC / MS / MS – Online Kopplung zur Bestimmung von Diuron in Wasserproben aus Kläranlagen
Brenn – Struckhofova und Cichna – Markl, 2006	BPA – AK	Bestimmung von BPA in Wein
Degelmann et al., 2006	Sulfonylharnstoff – AK	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Sulfonylharnstoff Herbiziden in Wasser – und Lebensmittelproben
Stidl und Cichna – Markl, 2007	Chloramphenicol – AK	Bestimmung von Chloramphenicol in Shrimps
Podlipna und Cichna – Markl, 2007	BPA – AK	Bestimmung von BPA in konserviertem Fisch
Schöringhumer und Cichna – Markl, 2007	a) Glucuronidase, Arylsulfatase b) BPA – AK	Bestimmung von BPA in Urinproben

3.2 Weitere Methoden zur Immobilisierung von Biomolekülen

Die am häufigsten angewendete Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen ist die kovalente Bindung an ein festes Trägermaterial. Die wichtigsten Trägermaterialien zur Immobilisierung von Biomolekülen sind Agarose und Cellulose.

Agarose wird entweder aus Agar oder direkt aus Algen gewonnen. Sie hat optimale physikalische Eigenschaften, ist elektroneutral, weitgehend biologisch inert und wird deswegen außer in der Immunaффinitätschromatographie auch gerne in der Gelfiltration eingesetzt. Die Agarose – Struktur lässt sich als ein Knäuel aus linearen Polysaccharid – Ketten beschreiben. Zwischen den einzelnen Ketten gibt es keine kovalenten Bindungen, sondern nur Wasserstoffbrücken. Dies führt zu einer geminderten thermischen Stabilität, einem Schrumpfen oder einer Schwellung bei einer Änderung der Ionenstärke oder der Dielektrizitätskonstante des Mediums, Schwierigkeiten beim Gefrieren und Trocknen, und der Löslichkeit der Agarose in Anwesenheit von denaturierenden Lösungsmitteln. Die Wasserstoffbrücken sind für die Festigkeit und Porosität der Agarose verantwortlich. Üblicherweise wird Epichlorhydrin zur Vernetzung einzelner Ketten angewendet. Erst dadurch wird die Agarose so stabil, dass sie in der Immunaффinitätschromatographie anwendbar wird.

[Dean et al., 1985]

Cellulose besteht aus linearen β – 1,4 verknüpften D – Glukoseketten, die unregelmäßig 1,6 verzweigt sind. Die Cellulose ist ein gängiges Trägermaterial, sie hat jedoch auch Nachteile. Sie besitzt keine Poren, und die einzelnen Partikel haben keine einheitliche geometrische Form. Diese Schwierigkeiten wurden jedoch mit neuartigen Cellulosepräparaten, deren Partikel sphärisch und porös sind, überwunden. **[Dean et al., 1985]**

Als weitere Trägermaterialien werden z.B. Sepharose, Dextran, Polyacrylamid, Eupergit oder Glas mit einer kontrollierten Porengröße angewendet. **[Dean et al., 1985]**

Bevor Biomoleküle an Trägermaterialien gebunden werden können, müssen diese aktiviert werden. Weit verbreitet ist die Cyanobromid Aktivierung. Hierbei reagiert

Cyanobromid mit vicinalen Diol – Gruppen von z.B. Agarose, und dabei wird eine reaktive Matrix gebildet, die in Folge z.B. mit Spacermolekülen oder direkt mit Biomolekülen reagieren kann. Diese Methode wird sehr oft verwendet, obwohl sie auch einige Nachteile hat. Bei der Reaktion entstehen auch geladene Isoharnstoff – Gruppen, die der Matrix Anionenaustauscher – Eigenschaften verleihen. Weiters sind die Isoharnstoff – Gruppen gegen einen nukleophilen Angriff empfindlich und daher instabil. Die Cyanobromid – aktivierten Matrices haben nur eine beschränkte Stabilität, Biomoleküle sollten daher möglichst bald nach der Aktivierung angekoppelt werden. Es kann auch zu einem Ausbluten der Biomoleküle kommen, dieses Phänomen verstärkt sich in Anwesenheit von aminhaltigen Lösungen. Um manche der beschriebenen Probleme zu umgehen, wird bereits Cyanobromid – aktivierte Agarose am Markt angeboten. Andere Aktivierungsmethoden sind z.B. die Aktivierung mit Oxiran, Triazin oder Carbonyldiimidazol. **[Dean et al., 1985]**

Die Immobilisierung von Biomolekülen mittels einer kovalenten Bindung bringt aber auch einige Nachteile mit sich. Durch die kovalente Bindung kann die Konformation des Biomoleküls verändert werden, was in weiterer Folge zur Veränderung der Konformation des aktiven Zentrums des Biomoleküls führen kann. Dadurch werden die Spezifität und die Stärke der Bindung zwischen Biomolekül und Analyt herabgesetzt. Weiters kann die kovalente Bindung eines Biomoleküls an das Trägermaterial auch in der Nähe oder direkt am aktiven Zentrum erfolgen, wodurch die Bindung eines Analytmoleküls komplett verhindert wird. Diese Nachteile können umgegangen werden, wenn die Biomoleküle mittels der Sol – Gel – Technik immobilisiert werden.

3.3 HPLC

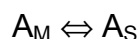
3.3.1 Theorie der Chromatographie

Die allgemeine Definition der Chromatographie lautet: „Chromatographie ist ein physikalisch – chemisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Substanzen zwischen zwei Phasen verteilt werden, von denen die eine, die stationäre Phase, festliegt, während die andere, die mobile Phase, sich in einer bestimmten Richtung bewegt“. [Cammann, 2001]

In den folgenden Kapiteln sollen die Grundlagen der Chromatographie erläutert werden. Dabei wird auf die Säulenchromatographie näher eingegangen.

3.3.1.1 Der Retentionsvorgang

Wie schon oben festgehalten, basiert die Chromatographie auf einer Verteilung der Analytkomponenten zwischen der mobilen und der stationären Phase. Nach der Aufgabe der Probe verteilen sich die Komponenten zwischen den beiden Phasen. Die mobile Phase fließt nun weiter durch die stationäre Phase und „trägt“ die Analytkomponenten entlang der Trennstrecke. Dabei wird immer wieder ein reversibles Verteilungsgleichgewicht zwischen den Analytmolekülen und den beiden Phasen eingestellt.



A_MAnalytmoleküle in der mobilen Phase

A_SAnalytmoleküle in der stationären Phase

Die einzelnen Analytkomponenten haben unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften, deshalb unterscheiden sie sich auch in der Stärke ihrer Wechselwirkung mit den beiden Phasen und dadurch auch in ihrer Verweildauer in der stationären bzw. mobilen Phase. Im Idealfall ist der Unterschied so groß, dass die Analytkomponenten die Trennstrecke voneinander getrennt verlassen.

Für jede Komponente der aufgetragenen Probe lässt sich eine Verteilungskonstante K_C aufschreiben:

$$K_C = \frac{C_S}{C_M}$$

C_SKonzentration der Komponente in der stationären Phase

C_MKonzentration der Komponente in der mobilen Phase

Je unterschiedlicher die Verteilungskonstanten der einzelnen Komponenten sind, desto besser werden sie voneinander getrennt. **[Cammann, 2001]**

3.3.1.2 Das Chromatogramm und wichtige Parameter

Nach dem Verlassen der Trennstrecke werden die Analytkomponenten mittels eines Detektors erfasst und das Detektorsignal gegen die Zeit aufgetragen. Diese Darstellung wird Chromatogramm genannt. Getrennte Substanzen werden als einzelne gaußförmige Peaks registriert. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 4 dargestellt.

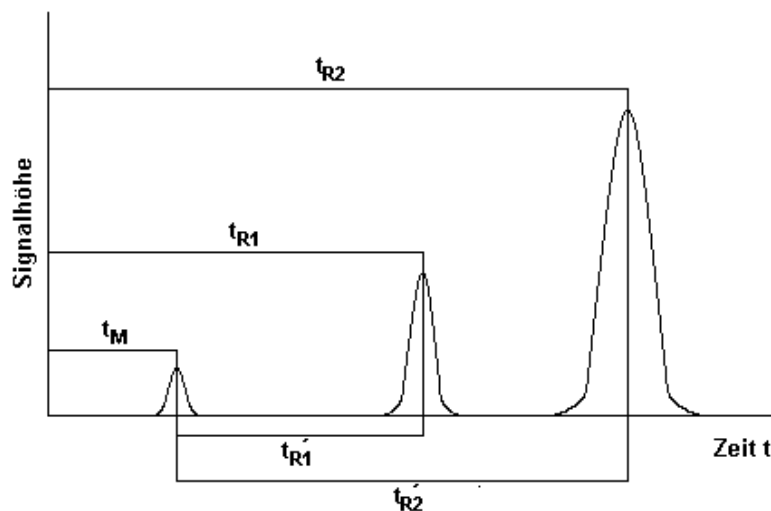


Abbildung 4: Beispiel eines Chromatogramms.

Der erste Peak im Chromatogramm ist der Injektionspeak, der von Substanzen erzeugt wird, die nicht retardiert werden, und mit der Geschwindigkeit u der mobilen Phase wandern.

$$u = \frac{L}{t_M}$$

LTrennstreckenlänge

t_MDurchflusszeit

Die um die Durchflusszeit t_M verminderte Retentionszeit t_R wird als reduzierte Retentionszeit t_R' bezeichnet:

$$t_R' = t_R - t_M$$

Aus dem Verhältnis der reduzierten Retentionszeit t_R' und der Durchflusszeit t_M wird der Retentionsfaktor k (auch Kapazitätsfaktor genannt) berechnet.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

Der Retentionsfaktor drückt aus, um wieviel länger sich die Probenmoleküle in der stationären Phase aufhalten als in der mobilen Phase. Für eine ideale Trennung wird ein Retentionsfaktor zwischen 1 und 5 angestrebt.

Die relative Retention zweier benachbarter Peaks wird durch den Trennfaktor α angegeben:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} = \frac{k_2}{k_1}$$

Das Volumenverhältnis der mobilen zur stationären Phase wird als Phasenverhältnis β bezeichnet.

$$\beta = \frac{V_M}{V_S}$$

V_MDurchflußvolumen

V_SVolumen der stationären Phase

Je kleiner β , desto größer ist der Anteil der stationären Phase am Volumen der Trennsäule.

Chromatogramme liefern sowohl qualitative als auch quantitative Informationen. Qualitative Aussagen können durch einen Vergleich der Retentionszeiten von Probenkomponenten mit denen von Standardsubstanzen gemacht werden.

Zur quantitativen Auswertung können sowohl die Peakflächen als auch die Peakhöhen herangezogen werden. Beide Parameter sind proportional zur Konzentration, die Auswertung über die Peakflächen ist vorzuziehen, denn die sie

sind von Schwankungen diverser Parameter (wie z.B. Temperatur, Geschwindigkeit der mobilen Phase) unabhängig. [Cammann, 2001]

3.3.1.3 Peakform und Peakverbreiterung

Wie schon erwähnt, haben die Peaks annähernd die Form einer Gaußfunktion. Diese Form entsteht auf dem Weg der Substanzmoleküle durch die Trennsäule. Die einzelnen Moleküle wechseln ständig zwischen der mobilen und der stationären Phase. Die Zeit, die sie in einer der Phasen verbringen, hängt davon ab, ob die Moleküle ausreichend Energie für den Übergang zwischen den Phasen besitzen. Für Moleküle, die länger in der mobilen Phase verbleiben, ergibt sich eine größere Wanderungsgeschwindigkeit als für die Moleküle, die in der stationären Phase verbleiben. Aus diesen individuellen Zufallsprozessen resultiert eine symmetrische Verteilung der Wanderungsgeschwindigkeiten um einen Mittelwert. Im Chromatogramm äußert sich diese Verteilung eben in der gaußförmigen Peakform (siehe Abbildung 5).

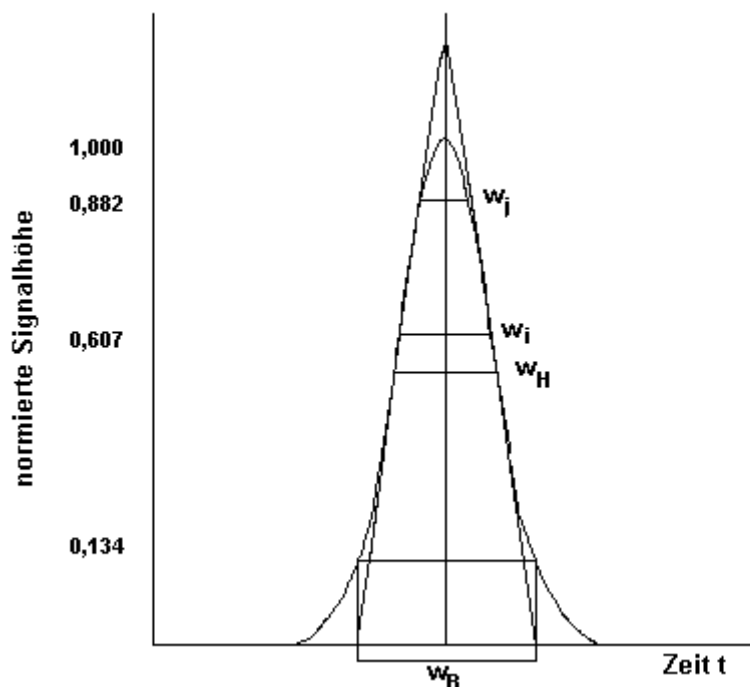


Abbildung 5: Chromatographischer Peak und Peakbreiten.

Die Gaußkurve wird mathematisch durch folgende Gleichung beschrieben:

$$y = y_0 \cdot e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

yPeakhöhe an jeder beliebigen Stelle des Peaks

y_0Höhe am Peakmaximum, (Peakmaximum befindet sich in $x = 0$)

xAbstand von der Ordinate

σStandardabweichung der Verteilung

σ^2Varianz der Verteilung

Wenn die Peakform nicht signifikant von einem gaußförmigen Verlauf abweicht, können drei verschiedene Peakbreiten abgelesen werden: die Basisbreite w_B , die Peakbreite in halber Peakhöhe w_H , die Peakbreite bei 60,7 % der maximalen Peakhöhe w_i und die Peakbreite bei 88,2 % der maximalen Peakhöhe w_j . Für diese Peakbreiten gelten folgende Beziehungen:

$$w_B = 4\sigma$$

$$w_H = 2\sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \ln 2} = 2,354\sigma$$

$$w_i = 2\sigma$$

$$w_j = \sigma$$

Die Peakbreiten sind der Abbildung 5 dargestellt.

In der Praxis kommt es aber häufig vor, dass Peaks eine deutliche Asymmetrie aufweisen. Es kann sich dabei entweder um Fronting handeln (Anstieg des Signals ist flacher als dessen Abfall) oder um Tailing (Abfall des Signals auf die Grundlinie ist flacher als dessen Anstieg). Tailing kommt häufiger vor.

Die Peakbreite ist direkt proportional zur Retentionszeit (je später ein Peak im Chromatogramm erscheint, desto größer ist seine Peakbreite) und umgekehrt proportional zur Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase. Mit der Variation der Lineargeschwindigkeit lässt sich die Trenneffizienz beeinflussen. Die Beziehung zwischen der Bodenhöhe und der Lineargeschwindigkeit wird durch die van Deemter – Gleichung beschrieben:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

ATerm für den Beitrag der Eddy – Diffusion

BAnteil der Longitudinaldiffusion

C.....Term der Verzögerung des Stoffaustausches zwischen den Phasen

In der Abbildung 6 sind der Kurvenverlauf der van – Deemter Funktion und die Beiträge der Eddy – Diffusion, der Longitudinaldiffusion und des Massentransportterms dargestellt.

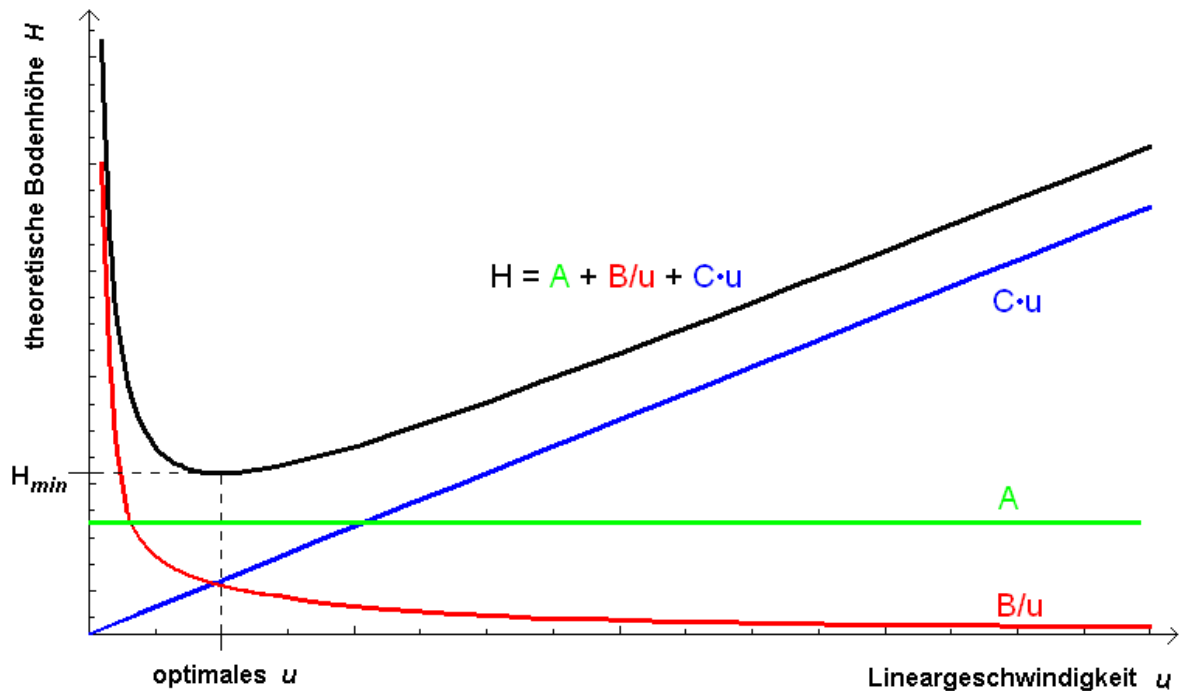


Abbildung 6: Kurvenverlauf der van – Deemter Funktion und Beiträge der Eddy – Diffusion, der Longitudinaldiffusion und des Massentransportterms.

Die Eddy – Diffusion beschreibt den Beitrag zur Bandenverbreiterung, verursacht durch die Wanderung der Substanzzone durch eine gepackte Säule. Die Moleküle müssen die Partikel des Packungsmaterials umwandern, daraus ergibt sich eine unterschiedliche Weglänge der einzelnen Moleküle durch die Säule.

Die Longitudinaldiffusion beruht auf der zufälligen Bewegung der Analytmoleküle in der mobilen Phase. Während sich die mobile Phase mit der Lineargeschwindigkeit u durch die Säule bewegt, diffundieren die Substanzmoleküle in alle Richtungen. Der Beitrag der Longitudinaldiffusion ist proportional zur Aufenthaltszeit der Probe in der Säule und zum Diffusionskoeffizienten des Analyten in der mobilen Phase.

Der Beitrag des Stoffaustausches ist von entscheidender Bedeutung für die Effizienz des Trennsystems. Er setzt sich zusammen aus dem Anteil des Massentransfers in der mobilen Phase und in der stationäre Phase. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen den Analytmolekülen und den beiden Phasen verläuft langsam. Während

der Wanderung durch die Trennsäule haben die Moleküle nicht genug Zeit, den Gleichgewichtszustand zu erreichen. An der Front einer Substanzzone treffen Analytmoleküle auf freie stationäre Phase. Der Gleichgewichtszustand wird nicht sofort eingestellt, und einige Teilchen werden bereits vor Erreichen des Gleichgewichtes von der mobilen Phase weitertransportiert. Parallel dazu finden ähnliche Prozesse am Ende der Zone statt, allerdings verweilen dort die Analytmoleküle länger in der stationären Phase. Beide Vorgänge führen zur Bandenverbreiterung, die zur Lineargeschwindigkeit u proportional ist. Der Anteil des Massentransfers in der stationären Phase ist für feste stationäre Phasen vernachlässigbar klein. Der Anteil des Massentransfers in der mobilen Phase ist umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten und macht sich in flüssigen mobilen Phasen am stärksten bemerkbar. Da der Diffusionskoeffizient direkt proportional zur Temperatur ist, lässt sich die Effizienz der Trennung neben der Optimierung der Lineargeschwindigkeit auch durch die Temperaturerhöhung verbessern.

Der Massentransfer in der mobilen Phase wird weiters noch von der Geometrie des Packungsmaterials beeinflusst. Alle Teilchen, die sich in den Poren der stationären Phase aufhalten, gelangen zuerst durch Diffusion auf die Partikeloberfläche, bevor sie in die fließende mobile Phase wechseln können. Sie wandern dadurch deutlich langsamer durch das chromatographische Bett als Teilchen, die direkt an der Partikeloberfläche adsorbiert werden.

In der Flüssigkeitschromatographie trägt noch ein weiterer Faktor zur Peakverbreiterung bei, dieser wird als Extra – Column – Effect H_{ex} bezeichnet. Der Beitrag wird durch folgende Beziehung beschrieben:

$$H_{ex} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot u}{24 \cdot D_M}$$

rRadius der Kapillare

uLineargeschwindigkeit

D_MDiffusionskoeffizient des Analyten in der mobilen Phase

Die Ursache der Zonenverbreiterung ist hier der Transport des Analyten durch die Kapillaren, die die einzelnen Komponenten des chromatographischen Aufbaus miteinander verbinden. Die Summe ihrer Volumina wird als Totvolumen bezeichnet.

Je größer das Totvolumen ist, desto breiter werden die Peaks. Dieses ist durch das laminare Strömungsprofil zu erklären: die Analytmoleküle in der Mitte der Kapillare bewegen sich mit größerer Geschwindigkeit als die in Wandnähe. Deshalb sind die Verbindungen so kurz wie möglich zu halten.

Neben den oben beschriebenen Mechanismen tragen weiters zur Peakverbreiterung alle Faktoren bei, die die laminare Strömung der mobilen Phase stören, wie z.B. Spalten oder Kanten in der Packung der stationären Phase, schlechte Verbindungen der Kapillaren usw. **[Cammann, 2001]**

3.3.1.4 Chromatographische Auflösung

Aus der Bodentheorie, die die Trennstrecke (Trennsäule) mit der Länge L in theoretische Böden teilt, in denen es jeweils zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen dem Analyten, der stationären und der mobilen Phase kommt, stammen folgende Parameter: Zahl der theoretischen Böden N und die Bodenhöhe H . Die beiden Parameter sind miteinander durch folgende Beziehung verknüpft:

$$H = \frac{L}{N}$$

Die Bodenzahl lässt sich weiters anhand der Retentionszeit t_R eines Analytpeaks und der Varianz σ^2 bzw. Peakbreite berechnen:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$
$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_B} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_H} \right)^2$$

Sowohl die Bodenzahl als auch die Bodenhöhe werden zur Demonstration der Effizienz der Trennsäule angegeben.

Mit dem Trennfaktor α lässt sich die Trennung zweier benachbarter Peaks beschreiben, er liefert jedoch keine Aussagen über die Güte der Peaktrennung, da die Peakbreite nicht berücksichtigt wird. Die Fähigkeit der Säule, zwei Substanzen voneinander zu trennen, wird durch die chromatographische Auflösung R_s beschrieben. Sie kann aus dem Abstand der Peakmaxima und dem Mittelwert der Basisbreiten w_B berechnet werden:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_{B1} + w_{B2})/2} = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{B1} + w_{B2})}$$

Bei zwei schmalen Peaks kann eine Näherung gemacht werden: $w_{B1} \approx w_{B2}$. Dann gilt:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{B2}}$$

Mit einer Auflösung von 1,5 sind zwei benachbarte Peaks gerade basisliniengetrennt. Durch die Substitution der Retentionszeiten t_R durch den Retentionsfaktor k und in weiterer Folge durch das Einführen des Trennfaktors α lässt sich die Beziehung für die Auflösung umformen:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{t_{R2}} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} = \frac{k_2 - k_1}{1 + k_2} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

$$R_S = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Wenn zwei benachbarte Peaks annähernd gleich breit sind, ist die Auflösung nur eine Funktion des Trennfaktors α , des Retentionsfaktors k_2 , und der Bodenzahl N . Durch Optimierung der Parameter kann die Auflösung verbessert werden. Der Retentionsfaktor wird durch die Änderung der Zusammensetzung oder Art der mobilen Phase variiert. Die Bodenzahl kann durch eine längere Säule oder eine kleinere Partikelgröße erhöht werden. Der Trennfaktor kann durch eine Vielzahl von Parametern vergrößert werden. Dazu zählen z.B. Änderung der Art oder Zusammensetzung der mobilen Phase, der Temperatur, der Qualität der stationären Phase usw. **[Cammann, 2001]**

3.3.2 HPLC – Apparatur

Die wichtigsten Bestandteile einer HPLC – Apparatur sind die Pumpe, der Injektor, die Trennsäule und der Detektor. Je nach Bedarf kann eine HPLC – Apparatur noch um weitere Komponenten erweitert werden, wie z.B. Entgaser, Säulenofen, Probengeber, zweite Pumpe, Trennsäule oder Detektor.

3.3.2.1 HPLC – Pumpe

Eine HPLC – Pumpe muss folgende Eigenschaften haben: sie muss einen konstanten, pulsarmen Fluss der mobilen Phase durch das HPLC System gewährleisten, die Flussrate muss im Bereich von ca. 0,1 bis 10 ml / min regulierbar sein, die Bestandteile der Pumpe, die in Kontakt mit der mobilen Phase treten, müssen korrosions – bzw. chemisch resistent sein, und die Pumpe soll eine hohe Lebensdauer und weitgehende Wartungsfreiheit aufweisen. Weiters sollte die Pumpe auch eine Gradientenelution ermöglichen.

Viele HPLC – Pumpen sind als Kolbenhubpumpen ausgeführt. In einem Pumpenkopf wird ein Kolben von einer Exzentrerscheibe angetrieben. Dieser Kolben bewegt sich in einer Lösungsmittelkammer hin und her. An diese Kammer ist mit einem Ventil das Vorratsgefäß der mobilen Phase angeschlossen, ein zweites Ventil leitet dann die mobile Phase in Richtung Trennsäule weiter. Die Kolbenbewegung kann in zwei Phasen eingeteilt werden: in der ersten Phase bewegt sich der Kolben von den Ventilen weg und das Kammervolumen wird dadurch vergrößert. In dieser Phase ist das Ventil zum Vorratsgefäß der mobilen Phase geöffnet und die mobile Phase füllt die Lösungsmittelkammer. Das Ventil in Richtung Trennsäule ist in dieser Phase geschlossen. In der zweiten Phase der Kolbenbewegung werden die Ventile umgeschaltet, der Kolben bewegt sich wieder auf sie zu, und dadurch wird die mobile Phase durch das offene Ventil in Richtung Trennsäule befördert. Die Bewegung der Exzentrerscheibe wird so gesteuert, dass die Fließgeschwindigkeit innerhalb eines Kolbenhubes konstant ist und dass ein annähernd rechteckiges Flussprofil entsteht. So wird die Flusskonstanz gewährleistet. Durch die Zuschaltung eines zweiten Pumpenkopfes, der um 180° versetzt arbeitet, und eine Feinabstimmung der beiden Pumpenköpfe auf einander wird weiters der pulsarme Fluss erzielt. Die Regulation der Fördermenge passiert ebenfalls durch die Steuerung der Bewegung der Exzentrerscheibe.

Die Pumpenteile, die in Kontakt mit der mobilen Phase treten, sind aus weitgehend inerten Materialien gefertigt: die Lösungsmittelkammer aus korrosionsbeständigem Edelstahl, die Kolben und Ventile aus Saphir.

Wenn die Pumpe einen Gradienten erzeugen soll, werden mehrere Vorratsgefäße über Schaltventile mit der Pumpe verbunden. Die Lösungsmittel werden noch vor der

Pumpe gemischt. Über die Schaltventile können die jeweiligen Lösungsmittelanteile und dadurch das Gradientenprofil gesteuert werden. [Cammann, 2001]

3.3.2.2 Injektor

Der Injektor befindet sich in der HPLC Apparatur zwischen der Pumpe und der Trennsäule. In der HPLC – Analytik hat sich das Sechswegventil als Injektor durchgesetzt. Das Ventil besteht aus zwei Teilen: einem fixen Teil, an dem sich auch die Anschlüsse für die Leitungen befinden, und einem beweglichen Teil, der mit einem Hebel ausgestattet ist, und in dem sich die Injektoröffnung befindet. Dieser Teil hat zwei Grenzpositionen, in der einen wird die Injektionsschleife mit der Probe befüllt, in der anderen wird die Probe auf die Säule aufgebracht. In der Abbildung 7 ist ein Injektor in seinen beiden Grenzpositionen abgebildet.

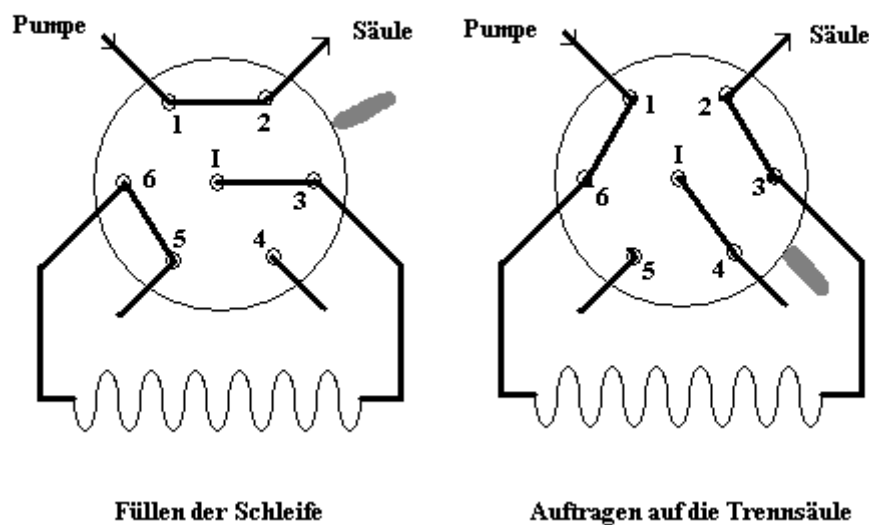


Abbildung 7: Injektor.

Die Zahlen 1 – 6 bezeichnen die sechs Anschlüsse des Ventils: Anschluss 1 für die Leitung der mobilen Phase von der Pumpe, Anschluss 2 für die Leitung der mobilen Phase zur Säule, Anschlüsse 3 und 6 sind für die Injektionsschleife und die Anschlüsse 4 und 5 für die Überläufe. Die Injektionsschleife bestimmt das Volumen der Probe, das auf die Säule aufgetragen wird. [Cammann, 2001]

3.3.2.3 Säulenofen

Die Temperatur ist direkt proportional zum Diffusionskoeffizienten. Der Diffusionskoeffizient hat wiederum einen direkten Einfluss auf die Peakverbreiterung, da er dem Massentransportkoeffizienten umgekehrt proportional ist, und dieser wiederum in dem Massentransportterm der van – Deemter Gleichung eine wichtige Rolle spielt. Damit die Ergebnisse reproduzierbar sind, wird die Säule in vielen Fällen in einen Säulenofen eingeschlossen und bei einer bestimmten Temperatur betrieben. [Otto, 2000]

3.3.2.4 HPLC – Trennsäule

Die HPLC – Säule ist zusammen mit der mobilen Phase für die Auftrennung der einzelnen Komponenten der Probenlösung verantwortlich. Sie besteht aus einer Stahlsäule, in der sich die stationäre Phase befindet. Die Stahlsäulen werden in verschiedenen Längen mit unterschiedlichen inneren Durchmessern angeboten. Bei den stationären Phasen gibt es zwei Haupttypen: die Normalphasen und die Umkehrphasen.

Bei den Normalphasensäulen ist die stationäre Phase polar, meistens besteht sie aus Kieselgel. Als mobile Phase werden unpolare Lösungsmittel eingesetzt, wie z.B. Pentan. Die Elutionskraft kann durch Zusatz von polarerer Lösungsmitteln gesteigert werden. Die Trennung der einzelnen Analytmoleküle basiert auf ihrer unterschiedlicher Polarität und den daraus resultierenden polaren Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der Probenlösung und der stationären Phase.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen Umkehrphasensäulen zum Einsatz. Auch hier besteht das Grundgerüst der stationären Phase aus Kieselgel. Die Kieselgelpartikel werden in verschiedenen Größen mit unterschiedlichen Porendurchmessern angefertigt. An die Oberfläche des Kieselgels werden Alkylketten gebunden (häufig C – 18 oder C – 8 Ketten), wodurch eine unpolare Schicht zu Stande kommt. Die Länge der Alkylketten kann beliebig variiert werden und zusätzlich können auch noch polare Gruppen an die Alkylketten gebunden

werden (z. B. Phenylgruppen), so dass am Markt eine stetig wachsende Anzahl an Umkehrphasensäulen angeboten wird. Als mobile Phase werden polare Lösungsmittel eingesetzt, wie Acetonitril oder Methanol. Die Elutionskraft kann durch Zusatz von unpolaren Lösungsmitteln gesteigert werden. [Cammann, 2001]

3.3.2.5 Detektoren

In der HPLC werden unterschiedliche Detektoren angewendet, wie der Brechungsindexdetektor, der Chemiluminiszenzdetektor, der amperometrische oder coulometrische Detektor und viele andere. Hier sollen der UV / vis – Detektor, der Fluoreszenzdetektor und der massenspektrometrische Detektor beschrieben werden.

3.3.2.5.1 UV / vis – Detektor

Im UV / vis – Detektor wird die Lichtabsorption im UV / vis – Bereich (200 – 780 nm) gemessen. Durch Energiezufuhr in Form eines Photons wird ein Elektron aus einem äußeren Molekülorbital in einen angeregten Zustand überführt. Die überschüssige Energie, die nun das Molekül besitzt, wird in Form von Wärme wieder an die Umgebung abgegeben. Im Vergleich zur Intensität des eingestrahlteten Lichtes ist die Intensität des Lichtes nach der Absorption abgeschwächt. Eine Absorption im UV / vis Bereich wird bei Molekülen beobachtet, die freie Elektronenpaare, Doppelbindungen oder am besten ein konjugiertes Doppelbindungssystem besitzen. Die Grundgleichung für die Absorption ist das Lambert – Beer'sche Gesetz:

$$E = \log I_0 / I = \varepsilon \times c \times d$$

E.....Extinktion

I_0Intensität des eingestrahlteten Lichtes

IIntensität des Lichtes nach Durchlaufen der Schichtdicke d

εmolarer Extinktionskoeffizient

cKonzentration

dSchichtdicke

Im Inneren des Detektors befindet sich eine Lichtquelle, die ein kontinuierliches Spektrum im UV – Bereich (Deuteriumlampe), im sichtbaren Bereich (Wolfram – Halogen – Lampe) oder im gesamten UV / vis – Bereich (eine Kombination aus beiden Lampen) emittiert. Durch einen Monochromator kann die gewünschte Wellenlänge ausgewählt werden. Das von der Lichtquelle ausgestrahlte Licht durchläuft die im Detektorfenster in der Längsrichtung platzierte Zelle. Die aufgrund der Lichtabsorption geänderte Intensität des Lichtes wird nach dem Austritt aus dem Detektorfenster in einem Photomultiplier detektiert. [Cammann, 2001]

3.3.2.5.2 Fluoreszenzdetektor

Während im UV / vis Detektor die Anregungswellenlänge und die Detektionswellenlänge gleich sind, sind beim Fluoreszenzdetektor die Anregungs – und Emissionswellenlängen unterschiedlich. Diese Tatsache beruht auf dem Mechanismus der Fluoreszenz.

Ein Analytmolekül befindet sich unter normalen Bedingungen im Grundzustand. Durch Lichtabsorption kann es zu einem Elektronenübergang in einen höheren, angeregten Zustand kommen. Nun wird die überschüssige Energie entweder strahlungslos oder strahlend abgegeben.

Strahlungslose Übergänge erfolgen innerhalb eines angeregten Zustandes als Rotations – oder Schwingungsübergänge, oder bei einem Übergang von einem höheren angeregten Zustand in einen niedrigeren. Diese Übergänge werden als interne Konversion bezeichnet. Erfolgen strahlungslose Übergänge zwischen einem angeregten Molekül und z.B. einem Lösungsmittelmolekül, werden sie als externe Konversion bezeichnet. Eine weitere Art der strahlungslosen Übergänge ist das Intersystemcrossing, ein Übergang zwischen zwei Energiezuständen, der mit einer Spinänderung verbunden ist.

Ein strahlender Übergang erfolgt vom niedrigsten angeregten Zustand in den Grundzustand. Dabei wird Licht einer bestimmten, für das Molekül charakteristischen Wellenlänge emittiert. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist länger als die des absorbierten Lichtstrahls.

Es gibt zwei Arten von Elektronenniveaus, den Singulettzustand (S) in dem die Elektronen einen antiparallelen Spin haben, und den Triplettzustand (T), in dem die

Elektronenspins parallel ausgerichtet sind. Erfolgt ein strahlender Übergang von einem angeregten Singulettzustand in einen Singulettgrundzustand, spricht man von Fluoreszenz. Erfolgt ein Übergang von einem angeregten Triplettzustand in einen Singulettgrundzustand, dann wird von Phosphoreszenz gesprochen.

Die Übergänge sind in der Abbildung 8 dargestellt. A steht hier für Absorption, F für Fluoreszenz, Ph für Phosphoreszenz, IC für interne Konversion und ISC für Intersystemcrossing.

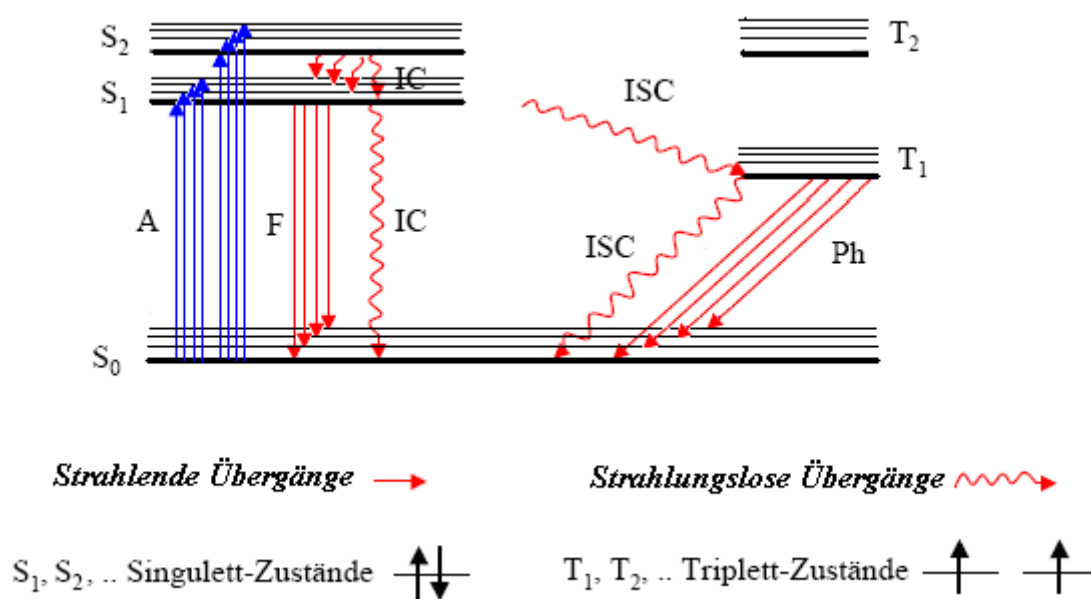


Abbildung 8: Jablonski Termschema.

Die Fluoreszenz ist ein kurzlebiges Phänomen, die Lebensdauer der Fluoreszenzübergänge liegt im Bereich von 10 ns, sie wird also nur während der Anregung beobachtet. Die Lebensdauer der Phosphoreszenz kann hingegen bis zu 10 s betragen. [Otto, 2000]

Als Lichtquelle wird in Fluoreszenzdetektoren oft eine Xenonlampe eingesetzt. Diese Xenonlampen können in Verbindung mit einem Monochromator über den gesamten UV / vis – Bereich als Anregungsquelle eingesetzt werden. Nach dem Durchgang des Lichtstrahles durch die Messzelle wird die Fluoreszenzstrahlung im 90° Winkel gegenüber der Lichtquelle gemessen, als Detektor wird ein Photomultiplier

verwendet. Für die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung gilt, basierend auf dem Lambert – Beerschen Gesetz, folgende Beziehung:

$$I_f \approx 2,303 \times \Phi \times I_0 \times \epsilon \times c \times d$$

I_f ...Intensität der Fluoreszenzstrahlung

Φ ...Quantenausbeute

I_0 ...Intensität der Anregungsstrahlung

ϵmolarer Extinktionskoeffizient

cKonzentration

dSchichtdicke

Fluoreszenz tritt stark bei aromatischen Molekülen mit kondensierten Ringen auf. Da die Fluoreszenzmessung bis zu drei 10er Potenzen empfindlicher ist als z.B. die UV / vis Messung, werden Analytmoleküle, die keine eigene Fluoreszenz aufweisen, oft mit Fluorophoren derivatisiert. **[Cammann, 2001]**

3.3.2.5.3 *Massenspektrometrischer Detektor*

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, bei dem aus Molekülen Ionen gebildet werden, die in weiterer Folge nach ihrem Masse zu Ladungs – Verhältnis (m / z) getrennt werden. Mittels Massenspektrometrie kann sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse erfolgen. Eine wichtige Aufgabe der Massenspektrometrie ist ihr Einsatz in der Strukturaufklärung unbekannter Moleküle.

Das massenspektrometrische Verfahren beginnt mit der Probeneinführung in das Massenspektrometer. Da die Probe vom Atmosphärendruck ins Vakuum überführt werden muss, bedarf die Probeneinführung eigener Techniken.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgt im Hochvakuum, wo die erzeugten Ionen bzw. Molekülfragmente stabil sind. Die Art der Ionisation bestimmt die Form der erzeugten Ionen und Fragmente. Es können, je nach angewendetem Ionisationsverfahren, positiv oder negativ geladene Teilchen entstehen. Die Art und Weise, wie die Moleküle in der Ionenquelle nach einer bestimmten Energiezufuhr

zerfallen, als auch die Intensität der beobachteten Molekülbruchstücke ermöglichen die Strukturaufklärung.

Die Ionentrennung erfolgt durch elektrische und magnetische Felder oder aufgrund unterschiedlicher Flugzeit der einzelnen Molekülbruchstücke. Es gibt sehr viele Möglichkeiten, wie die einzelnen Schritte erfolgen können, hier sollen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Techniken erläutert werden.

3.3.2.5.3.1 Probeneinführung und Ionisation

Probeneinlasssysteme haben die Aufgabe, feste, flüssige oder gasförmige Proben in das Massenspektrometer einzuschleusen, und zwar so, dass das Hochvakuum, das im Inneren des Massenspektrometers herrscht, nicht zusammenfällt. Ist das Massenspektrometer mit einem anderen Analysengerät gekoppelt, wie z.B. mit einem HPLC – oder GC – System, muss das Probeneinlasssystem auch noch die mobile Phase bzw. das Trägergas von den Analytmolekülen trennen, bevor sie in das Massenspektrometer gelangen.

Bei der LC / MS – Kopplung, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wurde ein Electrospray – Interface verwendet, bei dem Probeneinführung und Ionisation gleichzeitig erfolgen. Eine schematische Darstellung dieser Vorrichtung ist in Abbildung 9 wiedergegeben.

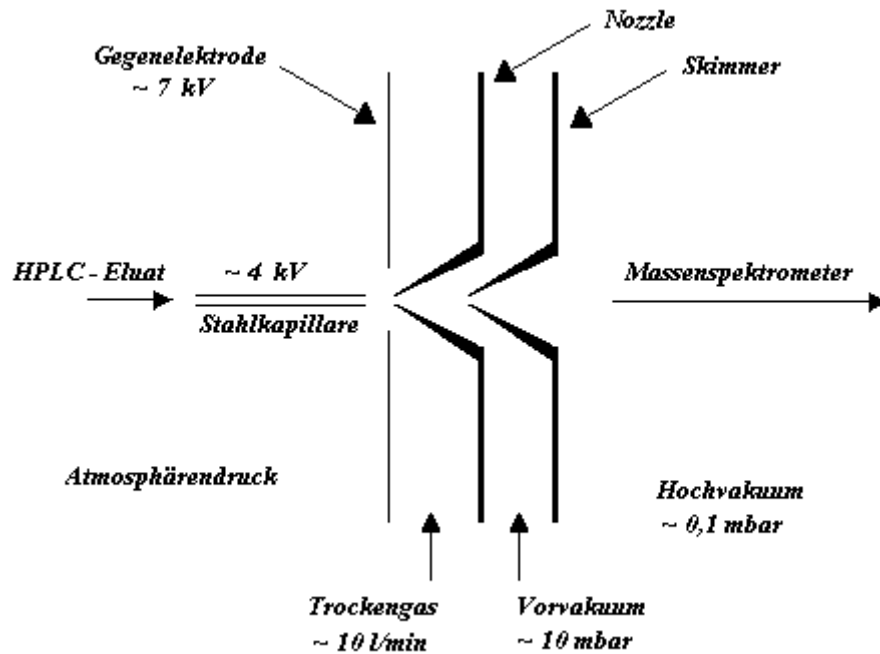


Abbildung 9: Electrospray – Interface.

Das HPLC – Eluat durchfließt eine Stahlkapillare, an der eine hohe elektrische Spannung angelegt ist. Der Raum zwischen der Stahlkapillare und der Gegenelektrode wird beheizt (ca. 300 °C, je nachdem, wie temperaturstabil die Probenkomponenten sind). Nach dem Austritt aus der Kapillare bildet das Eluat hochgeladene Flüssigkeitströpfchen. Am Weg zur Gegenelektrode verdampft das Lösungsmittel, die Ladung bleibt jedoch an den Analytmolekülen. Die Verdampfung wird durch das Einströmen von Trockengas und die hohe Umgebungstemperatur unterstützt. Weiters kommt es aufgrund der starken Abstoßungskräfte innerhalb der Tröpfchen zu ihrem explosionsartigen Zerfall (Coulomb Explosion) in kleinere Tröpfchen. Ist das Lösungsmittel schließlich ganz verdampft, bleiben Ionen mit einer großen Anzahl von Ladungen übrig. Je größer das Molekül, desto mehr Ladungen trägt es. Ob die Ladung positiv oder negativ ist, hängt von der angelegten Spannung an der Kapillare ab. Ist diese positiv, entstehen positive Ionen und umgekehrt.

Beim Eintritt in das Massenspektrometer passieren die Ionen zuerst die Nozzle, wodurch sie ins Vorvakuum gelangen. Hier muss die Lösungsmittelverdampfung vollständig abgeschlossen sein, da ins Hochvakuum, welches unmittelbar folgt, nur Analytmoleküle gelangen sollen. [Ardrey, 2003]

3.3.2.5.3.2 Ionentrennung

Die in der Ionenquelle gebildeten Ionen werden nach ihrem m/z Verhältnis aufgetrennt. Bei dem während dieser Arbeit eingesetzten LC / MS – System wurde eine Ionenfalle zur Auftrennung verwendet.

Eine schematische Darstellung der Ionenfalle wird in der Abbildung 10 gezeigt.

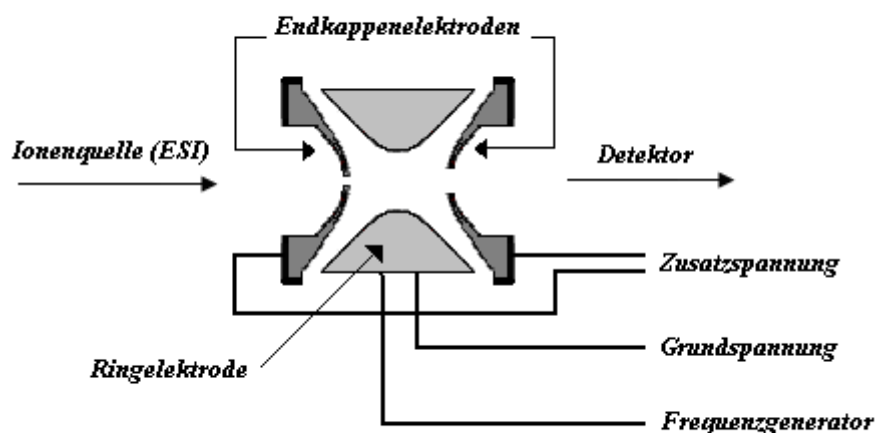


Abbildung 10: Aufbau einer Ionenfalle.

Molekülionen aus dem Elektrospray – Interface treten durch ein Gitter in den Raum der Ionenfalle hinein. In der Ionenfalle wird der physikalische Effekt ausgenutzt, dass Ionen unterschiedlicher Masse in einem Raum mit bestimmter Elektrodengeometrie durch hochfrequente elektrische Wechselfelder stabil eingefangen werden können. He – Gas mit einem Druck von etwa 10^{-5} mbar hilft bei der Stabilisierung der Ionen. Daraus ergeben sich die zwei Arbeitsweisen, in denen die Ionenfalle arbeiten kann: Im ersten Fall werden unter Einstellung einer bestimmten Wechselspannung nur Ionen mit einem bestimmten m/z – Verhältnis in der Ionenfalle gespeichert, alle anderen Ionen prallen gegen die Wände der Ionenfalle. Die „gefangenen“ Ionen werden anschließend aus der Ionenfalle ausgeschleust und der austretende Ionenstrom im Detektor registriert. So können bestimmte Molekülionen oder Bruchstücke des Analyten aus der Probe herausgefiltert werden.

Im zweiten Fall werden die Molekülionen auf stabilen Umlaufbahnen gehalten und der Reihe nach, nach ihrem m/z – Verhältnis, aus der Ionenfalle ausgeschleust, und detektiert. So kann das m/z Spektrum aufgenommen werden. **[Cammann, 2001]**

3.3.2.5.3.3 Detektion

Zur Registrierung des aus der Ionenfalle austretenden Ionenstromes werden Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) eingesetzt. SEV bestehen aus einer Reihe von Dynoden (Elektroden). Ein einzelnes Ion, das auf die erste Kathode trifft, schlägt zwei bis drei Elektronen heraus. Diese treffen dann auf die nächste Dynode und so wird eine Elektronenkaskade ausgelöst. Die Auffangsanode registriert schließlich das deutlich verstärkte Signal. Die erzielbare Signalverstärkung liegt etwa bei 10^7 . **[Otto, 2000]**

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 HPLC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere HPLC – Systeme verwendet: HPLC – System 1–1 zur Bestimmung von DON, die HPLC – Systeme 2–1 und 2–2 zur Bestimmung von ZON sowie ein LC / MS – System zur Identifizierung und Quantifizierung von DON und ZON. Im Folgenden werden die einzelnen Systeme und die im Rahmen der Arbeit entwickelten und verwendeten Methoden beschrieben.

4.1.1 Bestimmung von DON

Zur Bestimmung von DON wurde das HPLC System 1–1 verwendet. Zur Trennung wurde eine polar – modifizierte C – 18 Säule verwendet, die Elution erfolgte isokratisch mit einer mobilen Phase bestehend aus ACN : MeOH : H₂O_{bd} 10 : 10 : 80 (v:v:v). DON wurde mittels eines UV – Detektors bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert. Die genaue Beschreibung des HPLC – Systems 1–1 und der Methode ist im Kap. 5.1 zu finden.

Dieses HPLC – System wurde im Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 ng DON / ml kalibriert. Die Herstellung der zur Kalibration injizierten DON – Standardlösungen ist im Kap. 5.1.3 beschrieben.

Die Abbildung 11 zeigt stellvertretend ein Chromatogramm einer DON – Standardlösung mit einer Konzentration von 1000 ng / ml in PBS, das mit dem HPLC – System 1–1 gemessen wurde.

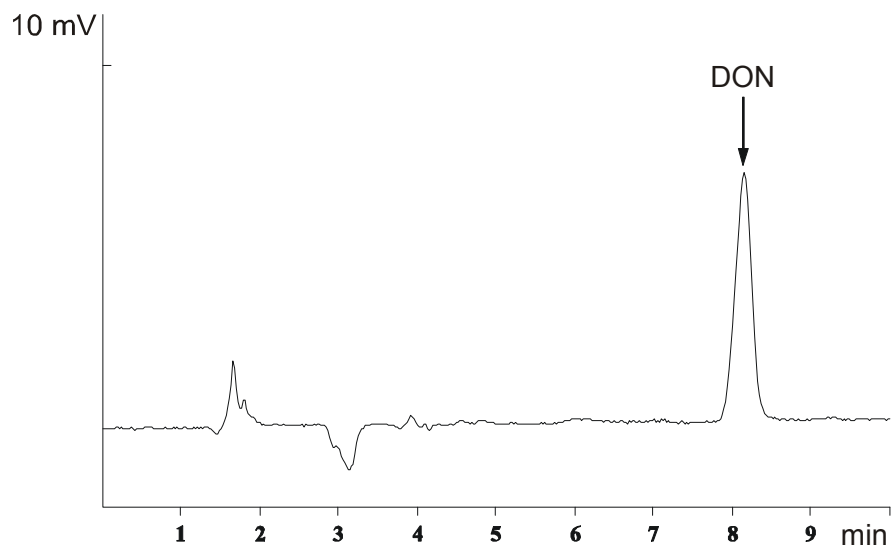


Abbildung 11: Chromatogramm einer DON – Standardlösung, Konzentration 1000 ng / ml in PBS, (HPLC – System 1–1).

In Abbildung 12 ist eine der für DON erhaltenen Kalibrierfunktionen graphisch dargestellt.

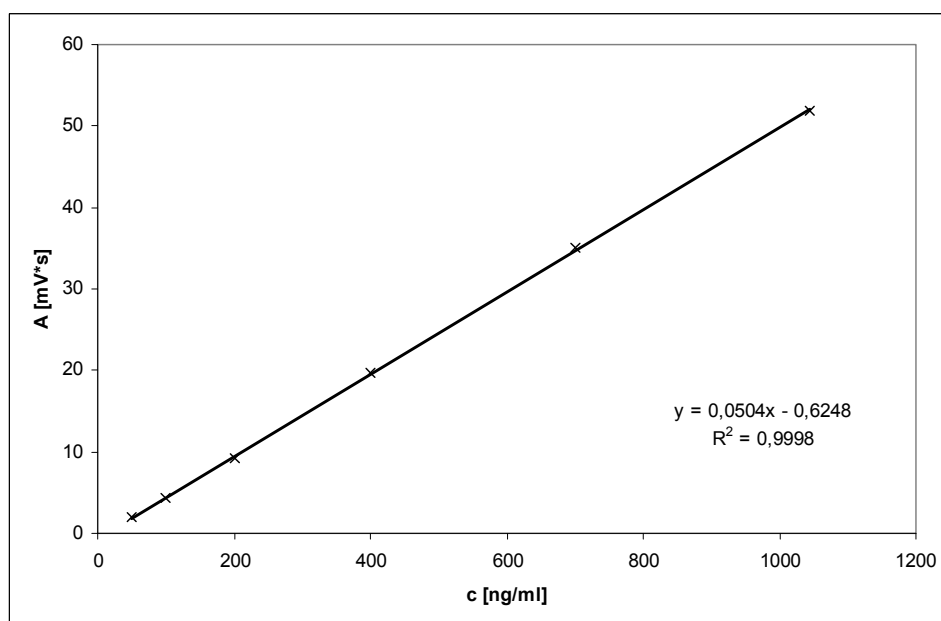


Abbildung 12: Beispiel einer Kalibrierfunktion für DON (HPLC – System 1–1).

Bei allen Kalibrationen, die im Rahmen der Dissertation durchgeführt wurden, war der Korrelationskoeffizient $r \geq 0,9988$. Die Nachweisgrenze ($S / N = 3$) betrug 20 ng / ml.

4.1.2 Bestimmung von ZON

Zur Bestimmung von ZON wurden zwei HPLC – Systeme verwendet. Das HPLC – System 2–1 wurde zur Methodenentwicklung verwendet, das HPLC – System 2–2 zur Messung von Realproben. In beiden HPLC – Systemen wurde dieselbe C – 18 Säule verwendet, die Elution erfolgte isokratisch mit einer mobilen Phase bestehend aus ACN:H₂O_{bd} 45:55 (v:v). ZON wurde in beiden Systemen mit einem Fluoreszenzdetektor erfasst. Das HPLC – System 2–1 war mit einer McDACq Auswertesoftware ausgestattet, das HPLC – System 2–2 wurde mit der Stratos – Software betrieben. Die genaue Beschreibung beider HPLC – Systeme und der Methoden ist im Kap. 5.1 zu finden. Die Kalibration beider Systeme erfolgte im Bereich von 0,5 bis 150 ng / ml. Die Herstellung der zur Kalibration injizierten Standardlösungen ist im Kap. 5.1.4 beschrieben.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen stellvertretend zwei Chromatogramme von ZON Standardlösungen, die mit den HPLC – Systemen 2–1 und 2–2 erhalten wurden.

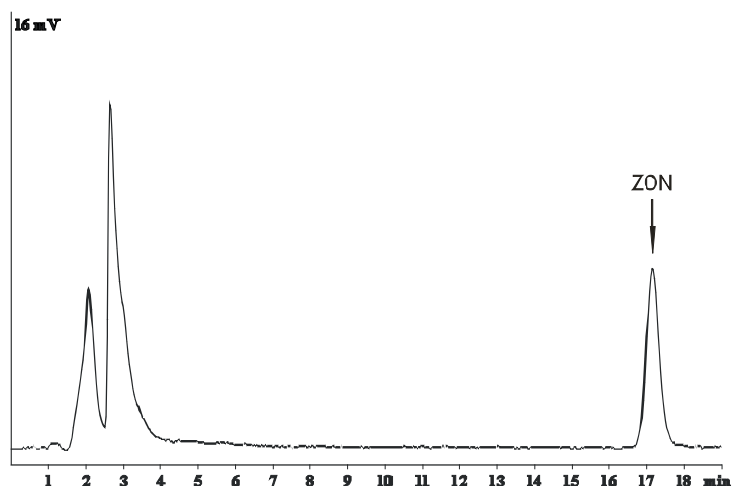


Abbildung 13: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung, Konzentration 50 ng / ml in Wasser (HPLC – System 2–1).

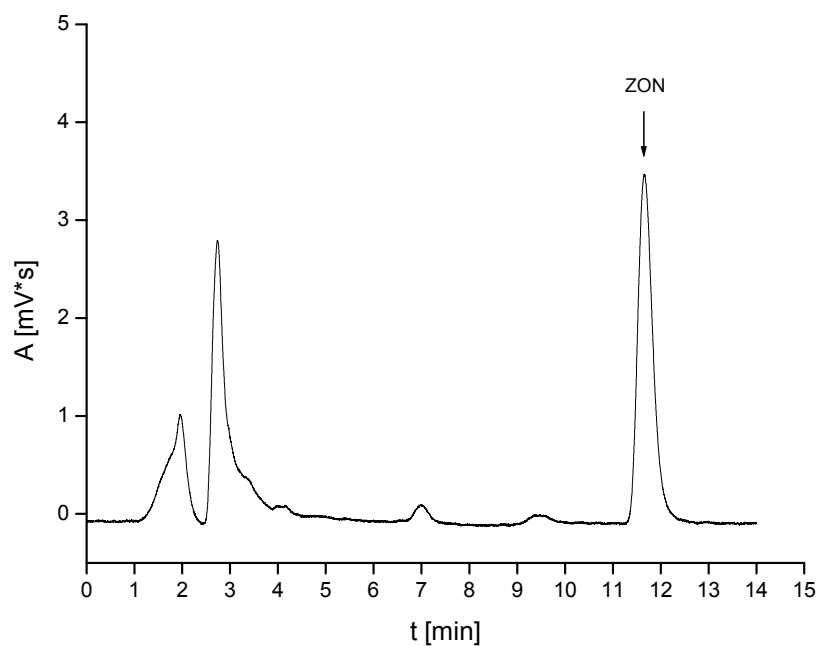


Abbildung 14: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung, Konzentration 100 ng / ml in Wasser (HPLC – System 2–2).

In den Abbildungen 15 und 16 sind zwei Beispiele der ZON – Kalibrierfunktionen graphisch dargestellt.

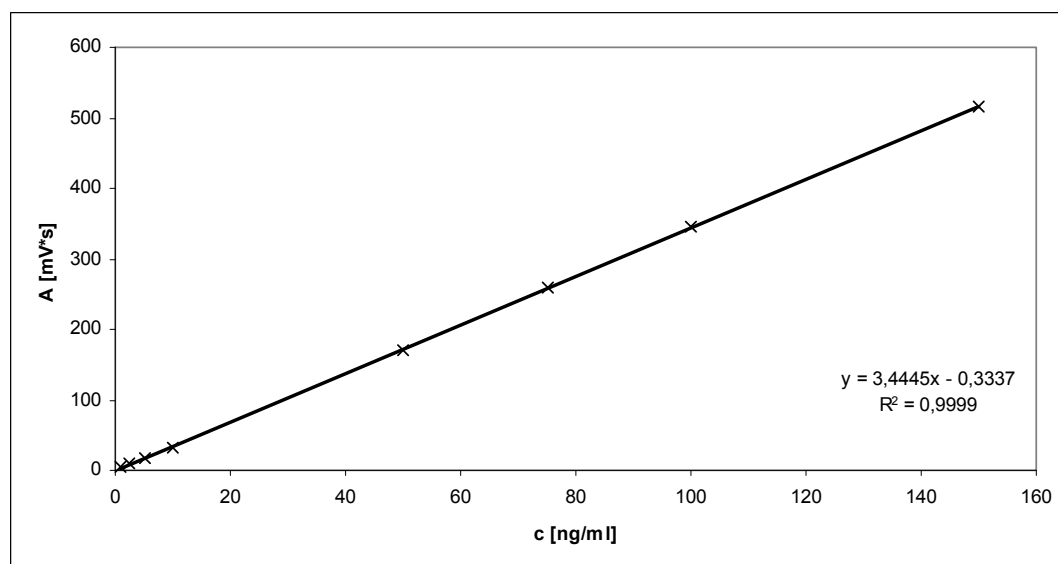


Abbildung 15: Beispiel einer Kalibrierfunktion für ZON (HPLC – System 2–1).

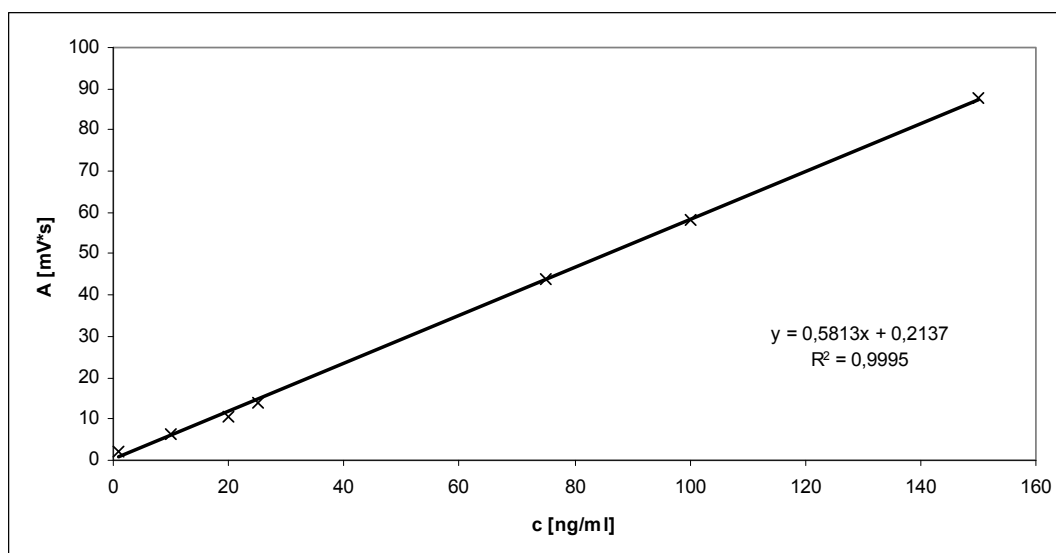


Abbildung 16: Beispiel einer Kalibrierfunktion für ZON (HPLC – System 2–2).

Bei allen Kalibrationen, die im Rahmen der Dissertation durchgeführt wurden, war der Korrelationskoeffizient $r \geq 0,9980$. Mit beiden Systemen wurde eine Nachweisgrenze ($S / N = 3$) von $0,5 \text{ ng / ml}$ erreicht.

4.1.3 Bestimmung von DON und ZON mittels LC / MS

Zur gleichzeitigen Bestimmung von DON und ZON wurde eine LC / MS Methode entwickelt. Die Zusammensetzung der verwendeten LC / MS Apparatur ist im Kap. 5.1.1 beschrieben, die Einstellungen der Ionenfalle für die Detektion und Fragmentierung von DON und ZON sind im Kap. 5.1.1.1 zusammengefasst. Die Einstellungen wurden in Vorversuchen für DON und ZON separat optimiert. Unter diesen Bedingungen wurden „Extracted ion Chromatogramme“ (EIC) –, MS – und MS2 – Spektren aufgenommen. Ein EIC erfasst Ionen mit einem bestimmten m / z Verhältnis in Abhängigkeit von der Zeit. Ein MS – Spektrum ist eine Aufnahme eines Massenspektrums zu einer bestimmten Zeit. Ein MS2 – Spektrum wird nach Fragmentierung eines ausgewählten Ions (mit einem bestimmten m / z Verhältnis) aufgenommen. Das Fragmentmuster und die Intensität der einzelnen Linien sind für Ionen (und Ionisationsmethoden) charakteristisch.

Zur Kalibration wurden Standardlösungen hergestellt, die sowohl DON (im Bereich von 50 bis 1000 ng / ml) als auch ZON (im Bereich von 10 bis 150 ng / ml) enthielten. In den Abbildungen 17 und 18 werden Chromatogramme von Standardlösungen

gezeigt. Die Retentionszeit von DON betrug 9,5 Minuten, die von ZON 11,7 Minuten. In den MS2 – Spektren sind die DON und ZON Fragmentierungsmuster zu sehen (Abbildungen 19 und 20). Die spezifischen m / z Linien für DON sind 276,8; 264,8; 246,9; 228,9; 217 und 203. Die spezifischen m / z Linien für ZON sind 298,8; 289,0; 273,0; und 261,0. Die jeweils zwei intensivsten Linien sind unterstrichen.

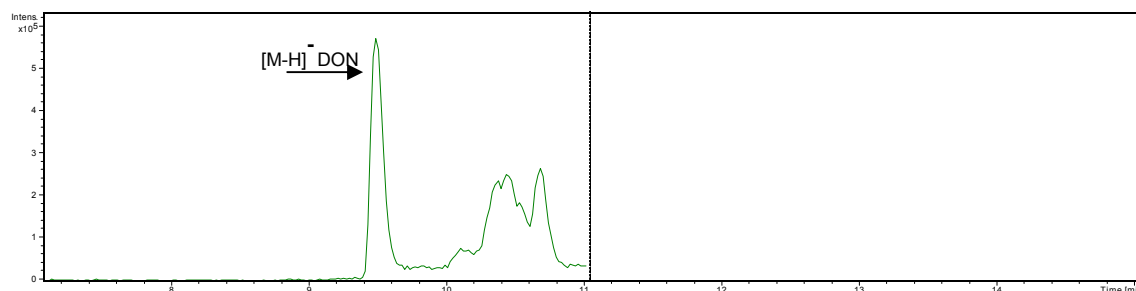


Abbildung 17: EIC (m / z = 295) einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON
Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H₂O.

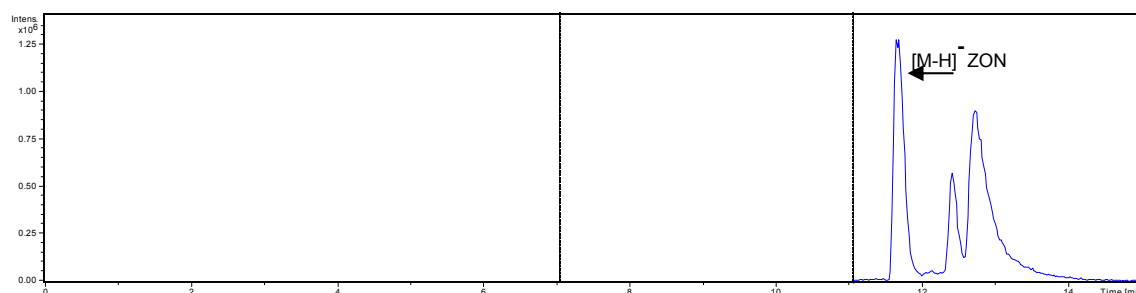


Abbildung 18: EIC (m / z = 317) einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON
Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H₂O.

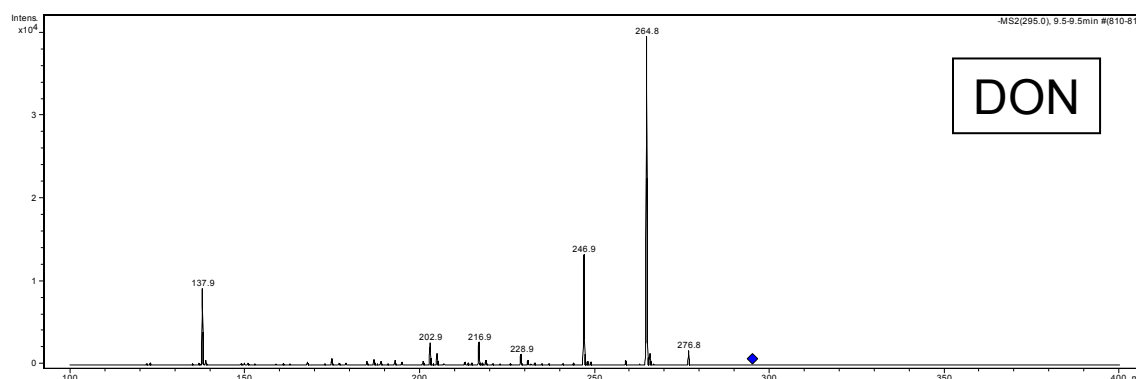


Abbildung 19: MS2 (m / z = 295) Spektrum einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON
Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H₂O.

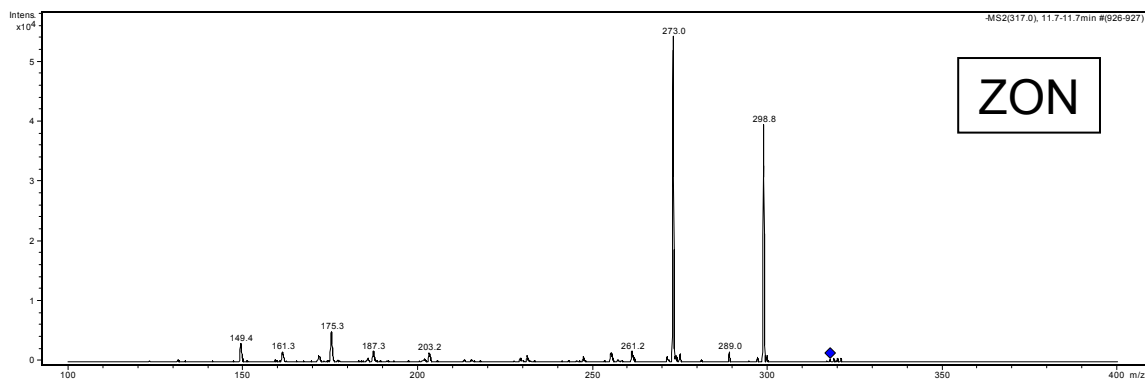


Abbildung 20: MS2 (m / z = 317) Spektrum einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H₂O.

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen représentative Kalibrierfunktionen für DON und ZON.

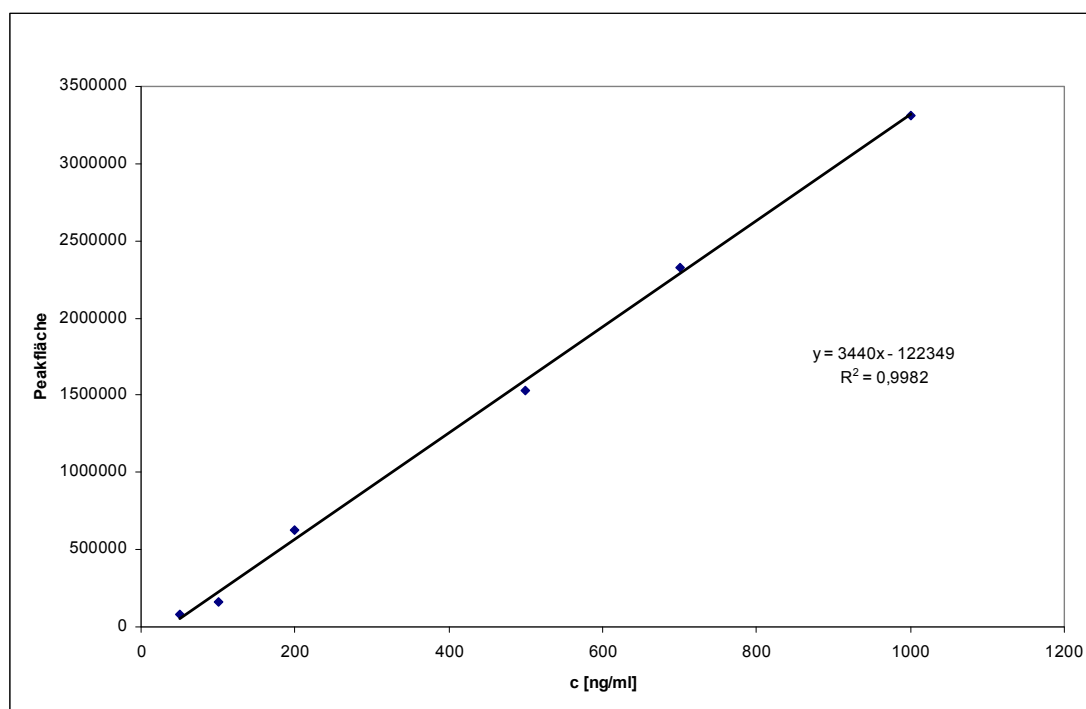


Abbildung 21: Kalibrierfunktion für DON (LC / MS – System).

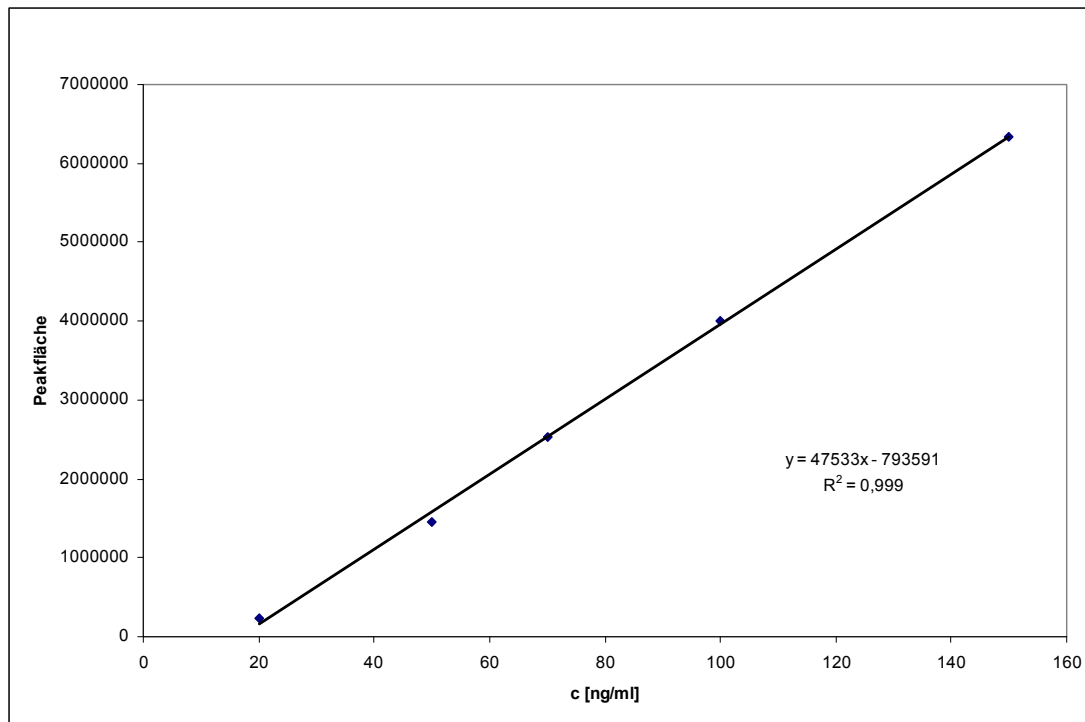


Abbildung 22: Kalibrierfunktion für ZON (LC / MS – System).

Mit dem LC / MS – System wurden folgende Nachweisgrenzen erzielt: 50 ng / ml für DON und 10 ng / ml für ZON.

4.2 Voruntersuchungen mit DON – Immunaффinitätssäulen

4.2.1 Herstellung der DON – Immunaффinitätssäulen

Im Rahmen der Dissertation wurden verschiedene DON – Immunaффinitätssäulen (IAS) mit monoklonalen DON – Antikörpern hergestellt, die sich in der Menge der immobilisierten DON – AK unterschieden. Die Herstellung der IAS ist im Kapitel 5.2.2 beschrieben.

4.2.2 Bestimmung der Durchbruchkapazität der DON – IAS

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass 1 mg der verwendeten DON – Antikörper in Lösung 2 µg DON binden können. Da die AK in einer Sol – Gel – Säule in Poren eingeschlossen sind, ist es wahrscheinlich, dass ein gewisser Anteil der immobilisierten AK nicht zugänglich ist. Um die Bindungskapazität der Sol – Gel immobilisierten AK bestimmen zu können, wurde eine Säule, die 0,5 mg DON – Antikörper enthielt, hergestellt und mit 10 ml einer DON – Standardlösung (Konzentration: 100 ng / ml in H₂O) beladen. Am Ende der Säule wurden Fraktionen á 1 ml gesammelt und die DON – Konzentration in diesen Fraktionen mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt (siehe Kap.5.2.10.1).

In Abbildung 23 ist die erhaltene Durchbruchkurve dargestellt. Auf der Y – Achse sind die Wiederfindungen, die für die einzelnen Fraktionen berechnet wurden, aufgetragen, auf der X – Achse die Fraktionsnummern. Eine Säule, die 1 mg DON – AK enthielt, konnte 1000 ng DON binden, bevor es zu einem Durchbruch von DON kam.

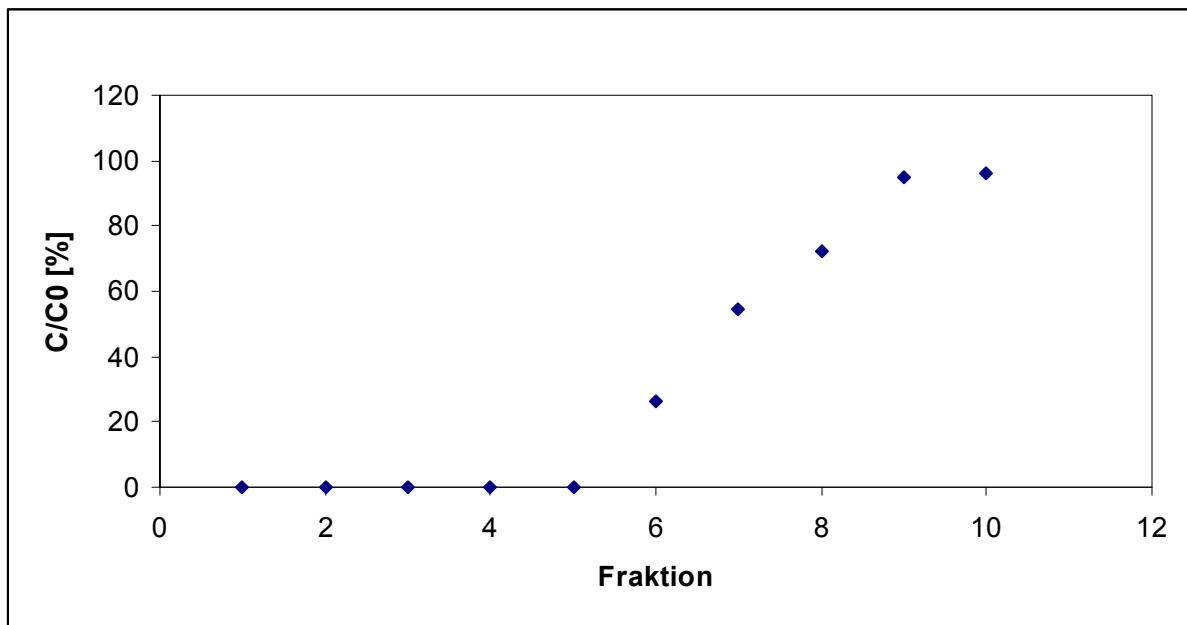


Abbildung 23: Durchbruchkurve von DON. Säule: 0,5 mg DON – AK, Konzentration der Standardlösung: 100 ng / ml, Fraktionsvolumen: 1 ml.

4.2.3 Retentionsmechanismus von DON

Der vorige Versuch hat gezeigt, dass DON in der DON – IAS retentiert wurde. Als nächstes galt es, den zugrunde liegenden Retentionsmechanismus zu untersuchen. Es sollte festgestellt werden, ob DON tatsächlich aufgrund einer spezifischen Wechselwirkung mit den DON – AK retentiert wurde oder z.B. aufgrund der Adsorption an der Sol – Gel – Matrix oder einer unspezifischen Bindung mit den Antikörpern in der Säule zurückgehalten wurde.

Dazu wurden drei Säulen hergestellt (siehe Kap. 5.2.2), in denen entweder 1 mg von unspezifischen Antikörpern aus Kaninchen, 0,5 mg der DON – AK oder keine AK immobilisiert waren. Die Retention von DON in den Säulen wurde mit einer 100 ng / ml DON – Standardlösung untersucht, wobei während des Beladens, Waschens und Eluierens jeweils 5 Fraktionen á 1 ml gesammelt wurden (siehe Kap. 5.2.13). Die Konzentration von DON in den einzelnen Fraktionen wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt.

Abbildung 24 zeigt die DON – Konzentrationen in den gesammelten Aufgabe –, Wasch – und Elutionsfraktionen.

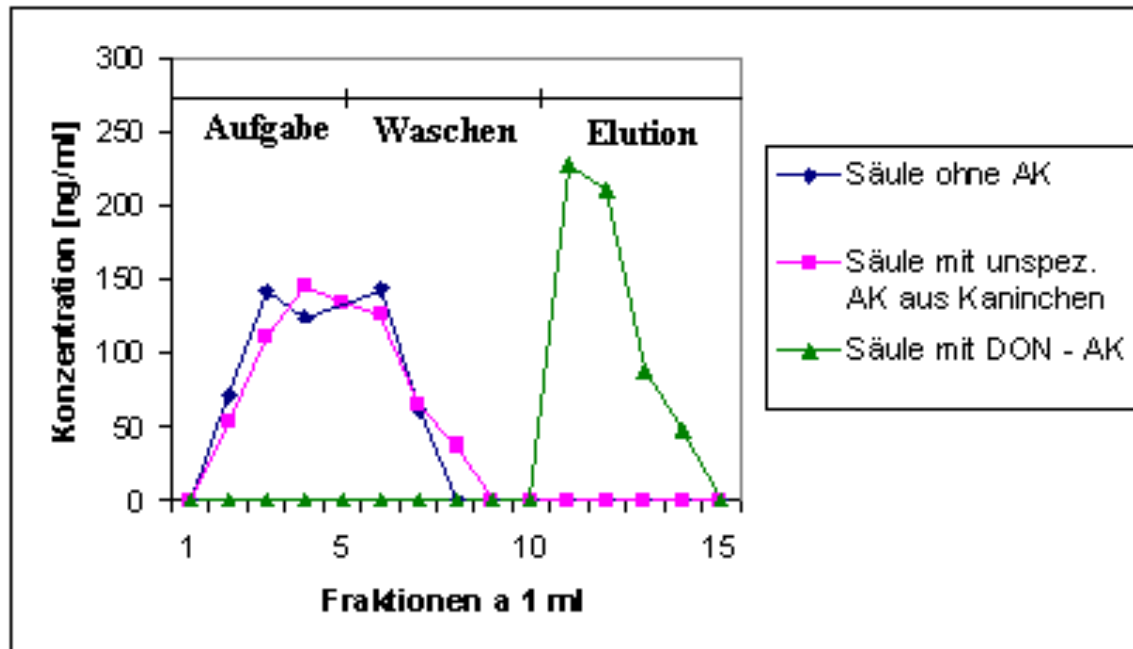


Abbildung 24: Konzentration von DON in den Aufgabe–, Wasch–, und Elutionsfraktionen. Fraktionsvolumen: 1 ml.

Sowohl bei der Säule mit „leerem“ Sol – Gel – Glas als auch bei der Säule mit unspezifischen Antikörpern wurde DON bereits in Fraktionen gefunden, die beim

Beladen (Fraktionen 1 – 5) bzw. beim Waschen (Fraktionen 6 – 10) der Säulen gesammelt worden waren. Bei der Säule, die DON – Antikörper enthielt, wurde DON weder in den Aufgabe – noch in den Waschfraktionen nachgewiesen (siehe Abbildung 24). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Retention von DON auf eine spezifische Wechselwirkung mit den DON – AK zurückzuführen ist. Eine Retention aufgrund einer unspezifischen Wechselwirkung mit dem Sol – Gel – Glas oder eine Wechselwirkung mit unspezifischen AK kann ausgeschlossen werden.

4.2.4 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Antikörper sind im Allgemeinen nicht absolut spezifisch für ein bestimmtes Epitop, d.h. es können Kreuzreaktivitäten mit ähnlichen Epitopen auftreten. Wenn kreuzreagierende Substanzen, die in der Immunaффinitätssäule retentiert werden, nicht mittels der folgenden Trennmethode vom Analyten getrennt werden, kann das Ergebnis mit einem systematischen Fehler behaftet sein.

Vom Hersteller der Antikörper wurden uns die mittels eines kompetitiven „Enzyme linked immunosorbent assays“ (ELISA) ermittelten Kreuzreaktivitäten übermittelt. Diese Daten erlauben jedoch keine Rückschlüsse auf die Retention der Substanzen in der Immunaффinitätssäule, da im ELISA die Antikörper im Unterschuss vorlagen, in der Immunaффinitätssäule jedoch im Überschuss eingesetzt werden.

Daher sollte als nächstes geprüft werden, ob kreuzreagierende Substanzen in der DON – IAS retentiert werden. Dazu wurde eine DON – IAS, in der 0,5 mg DON – AK immobilisiert waren, mit 5000 ng der kreuzreagierenden Verbindungen beladen und der gebundene Anteil ermittelt (siehe Kap. 5.2.14).

Folgende kreuzreagierende Verbindungen wurden untersucht:

Deepoxy – DON (DOM)

3 – Acetyl – DON (3 – A – DON)

15 – Acetyl – DON (15 – A – DON)

Um die Konzentrationen der kreuzreagierenden Substanzen in den Eluaten bestimmen zu können, war es zuvor notwendig, das HPLC – System 1–1 durch Injektion von Standardlösungen zu kalibrieren (siehe Kap. 5.1.3).

Die Abbildung 25 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm einer Standardlösung, die DON, DOM, 15 – A – DON und 3 – A – DON enthielt.

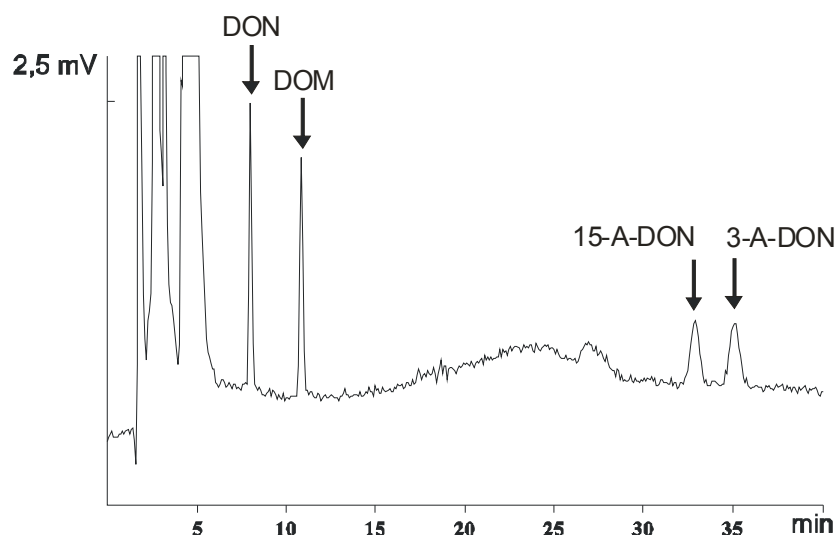


Abbildung 25: Chromatogramm einer Standardlösung, die DON, DOM, 15 – A – DON und 3 – A – DON enthielt. Die Konzentration der Verbindungen betrug jeweils 300 ng / ml (HPLC – System 1–1).

Die Retentionszeiten von DOM, 15 – A – DON und 3 – A – DON betrugen 10,3, 32,3 und 35,0 Minuten. Durch Injizieren von DOM –, 15 – A – DON – und 3 – A – DON – Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 50 – 300 ng / ml wurde das HPLC – System 1–1 kalibriert. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden waren $\geq 0,9990$.

Tabelle 5 zeigt die Kreuzreaktivität in der Immunaффinitätssäule und zum Vergleich die im ELISA festgestellten Werte (DOM wurde im ELISA nicht getestet).

Tabelle 5: Vergleich der Kreuzreaktivitäten in der Säule und im ELISA.

Kreuzreagierende Verbindung	Kreuzreaktivität in der Säule [%]	Kreuzreaktivität im ELISA [%]
DON	100	100
DOM	42	Keine Angabe
15 – A – DON	0	103
3 – A – DON	56	639

Sowohl DOM als auch 3 – A – DON wurden in der Säule retentiert. Im Unterschied zum ELISA, bei dem eine Kreuzreaktivität mit 15 – A – DON festgestellt worden war, wurde 15 – A – DON in der Säule nicht retentiert. Die relativ hohen Kreuzreaktivitäten stellten aber in der vorliegenden Arbeit kein Problem dar, da die angewandten chromatographischen Bedingungen die Trennung von DON und den kreuzreagierenden Verbindungen gewährleisteten (siehe Abbildung 25).

4.2.5 Optimierung der Operationsbedingungen

Die Immunaффinitätschromatographie als Methode zur Probenvorbereitung besteht im Allgemeinen aus drei Schritten: der Probenaufgabe, dem Waschschrift und der Elution. Diese Schritte müssen so optimiert werden, dass eine maximale Wiederfindung des Analyten erreicht und eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistet werden.

Um eine Wiederverwendbarkeit der Säule zu gewährleisten, sollen nicht allzu drastische Bedingungen angewendet werden, damit es zu keiner irreversiblen Denaturierung der Antikörper kommt.

4.2.5.1 Wahl des Aufgabemediums

Um den Einfluss des Aufgabemediums auf die Wiederfindung von DON zu untersuchen, wurden DON – Standardlösungen in verschiedenen Aufgabemedien (PBS, 5 % ACN und 10 % ACN) mit einer Konzentration von 100 ng / ml hergestellt. Diese wurden auf eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON Antikörper immobilisiert waren, aufgegeben und am Ende der Säule Fraktionen á 1 ml gesammelt. Die DON – Konzentration in den Fraktionen wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.11). Aus der Abbildung 26 ist ersichtlich, dass nur PBS als Aufgabemedium geeignet ist. Bereits eine Konzentration von 5 % Acetonitril in der Aufgabelösung bewirkt, dass DON relativ früh durchbricht.

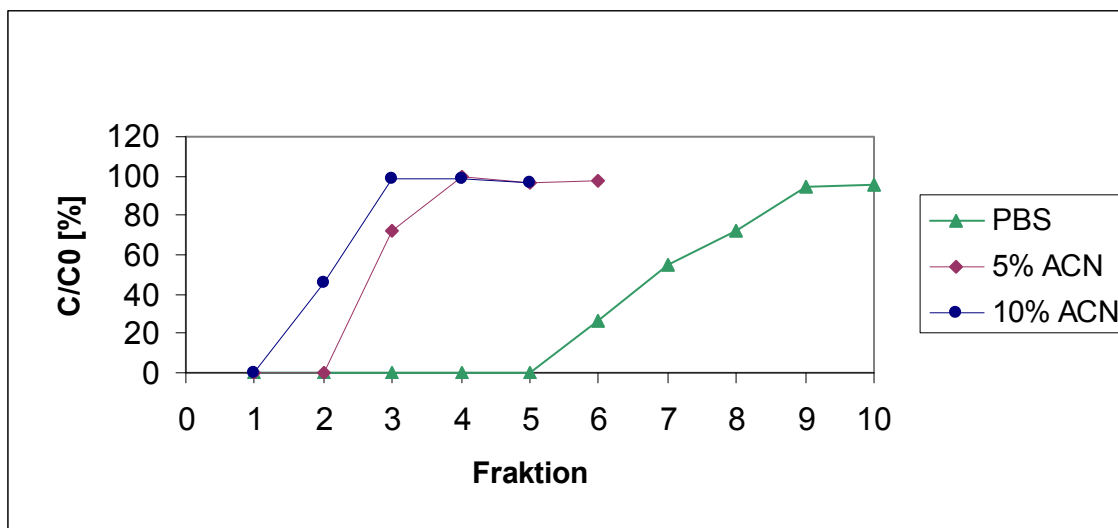


Abbildung 26: DON – Durchbruchkurven in Abhängigkeit vom Aufgabemedium. Säule: 0,5 mg DON – AK, Konzentration der Standardlösung: 100 ng / ml, Fraktionsvolumen: 1 ml.

4.2.5.2 Einfluss des pH – Wertes des Aufgabemediums auf die Wiederfindung von DON

Die Stärke der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper ist sehr stark vom pH – Wert abhängig. Deshalb wurde als nächstes untersucht, in welchem Bereich der pH – Wert des Aufgabemediums liegen kann, ohne die AG – AK Bindung zu schwächen und in der Folge die Wiederfindung von DON herabzusetzen. Dazu wurden jeweils 5 ml von DON – Standardlösungen mit einer Konzentration von 100 ng / ml in PBS mit einem pH – Wert von 5,0 bis 8,0 auf die Säule, in der 1 mg DON Antikörper immobilisiert war, aufgegeben. Nach dem Waschschrift wurde die DON – Wiederfindung im Eluat mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.12.1). Die erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass im untersuchten pH – Bereich kein Einfluss auf die Wiederfindung von DON festzustellen ist (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Einfluss des pH – Wertes der Auftragslösung auf die Wiederfindung von DON.

pH – Wert	Wiederfindung [%]
5,0	97
6,0	95
7,0	94
8,0	96

4.2.5.3 Wahl des Waschmediums

Der Waschschrift spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Entfernung von Matrixkomponenten aus Realproben.

Da sich bei der Optimierung des Aufgabeschrittes gezeigt hatte, dass bereits geringe Konzentrationen an ACN im Aufgabemedium auf DON eluierend wirken, wurden keine weiteren Versuche unternommen, um den Waschschrift zu optimieren. In allen folgenden Versuchen wurde die Säule mit 5 ml PBS gewaschen.

4.2.5.4 Wahl des Elutionsmittels und des Elutionsvolumens

An ein geeignetes Elutionsmittel werden folgende Anforderungen gestellt: es soll die vollständige Elution des Analyten in einem möglichst kleinen Elutionsvolumen ermöglichen, aber so schonend sein, dass es zu keiner irreversiblen Denaturierung des AK kommt, damit die Säule regeneriert und wieder verwendet werden kann. Da sich in früheren Arbeiten Acetonitril – Wasser – Mischungen als geeignete Elutionsmittel erwiesen haben, wurden auch in der vorliegenden Arbeit verschiedene Mischungen aus ACN und H₂O getestet. Je geringer die ACN – Konzentration, desto schonender ist die Elution. Mit der ACN – Konzentration sinkt aber auch die Elutionskraft. Das Ziel war daher herauszufinden, bei welcher ACN – Konzentration DON vollständig von der Säule eluiert werden konnte. Dazu wurde eine Säule, in der 1 mg DON – AK immobilisiert war, mit 1 000 ng DON beladen. Als Elutionsmittel wurden ACN – Wasser Mischungen mit einem ACN – Anteil von 10, 20, 30 bzw. 40 % verwendet, das Elutionsvolumen betrug jeweils 5 ml. Es wurden Elutionsfraktionen á 0,5 ml gesammelt und die DON Konzentration mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.9.1). Um Aliquote der Eluate in das HPLC – System injizieren zu können, musste zuvor jedoch ACN im Stickstoffstrom entfernt werden und danach der Rückstand in 0,5 ml H₂O aufgenommen werden.

Die Abbildung 27 zeigt die in den einzelnen Eluatfraktionen gefundenen DON – Mengen, in Abhängigkeit von der ACN – Konzentration des Elutionsmittels. Bei der Elution mit 40 % ACN wurde eine Gesamtwiederfindung von 96 % erzielt. Die Elution mit 10, 20 bzw. 30 % ACN führte nur zu Wiederfindungsraten von 48, 65 und 81 %.

Um eine vollständige Elution von DON zu erreichen, wurden daher in den folgenden Versuchen 4 ml einer wässrigen 40 % ACN Lösung zur Elution verwendet.

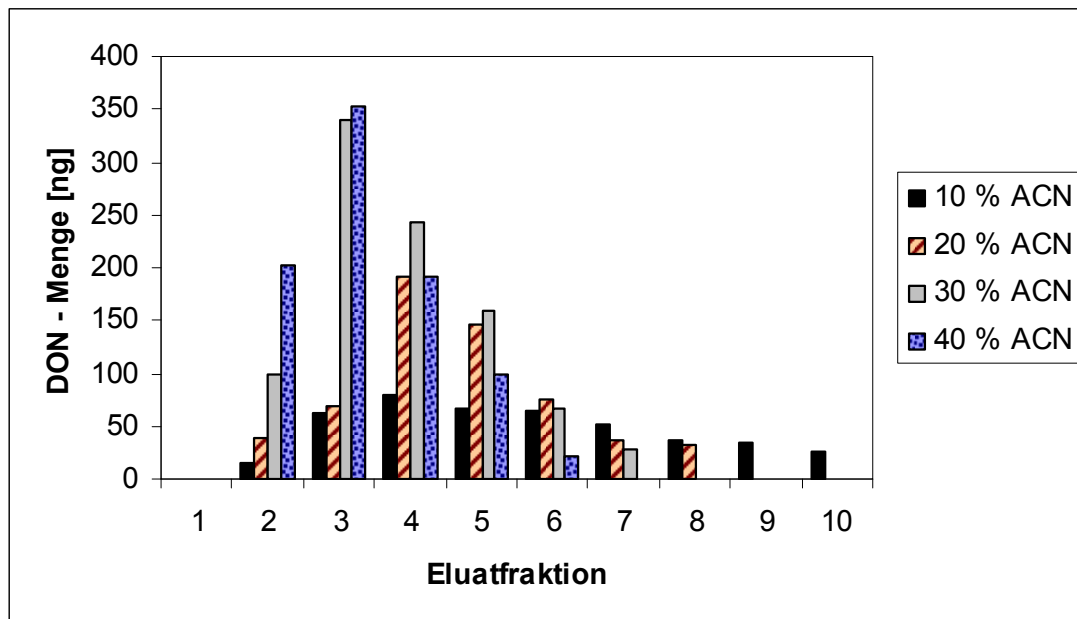


Abbildung 27: Die in den einzelnen Elutfraktionen gefundene DON – Menge in Abhängigkeit von der ACN – Konzentration des Elutionsmittels. Säule: 1 mg DON – AK, Fraktionsvolumen: 0,5 ml.

4.2.5.5 Optimierung der Aufgabegeschwindigkeit

Da die Kinetik von Reaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern üblicherweise relativ langsam ist, können in der Immunaффinitätschromatographie keine hohen Aufgabegeschwindigkeiten angewendet werden. Um in der vorliegenden Arbeit den Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von DON zu untersuchen, wurde eine DON – Standardlösung mit einer Konzentration von 100 ng / ml auf eine Immunaффinitätssäule aufgebracht, in der 1 mg DON – AK immobilisiert war. Die Fließgeschwindigkeit beim Auftragen der Standardlösung wurde mit Hilfe einer Pumpe auf 0,5, 1, 1,5 bzw. 2 ml / min eingestellt. Danach wurde die Säule gewaschen und DON von der Säule eluiert. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt und anschließend die Wiederfindung von DON berechnet (siehe Kap. 5.2.6.1).

In der Tabelle 7 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 7: Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von DON.

Aufgabegeschwindigkeit [ml / min]	Wiederfindung von DON [%]
0,5	93
1,0	91
1,5	87
2,0	95

Aus der Tabelle 7 geht hervor, dass eine Aufgabegeschwindigkeit im Bereich von 0,5 bis 2 ml / min im Standardversuch keinen Einfluss auf die Wiederfindung von DON hat.

4.2.5.6 Einfluss der DON – Konzentration und des Aufgabevolumens auf die Wiederfindung von DON

Um sicherzustellen, dass die Wiederfindung von DON nicht von der DON – Konzentration in der Aufgabelösung und dem Aufgabevolumen beeinflusst wird, wurden jeweils 300 ng DON in unterschiedlichen Konzentrationen und Aufgabevolumina auf eine Immunaффinitätssäule aufgegeben, in der 1 mg DON – AK immobilisiert war. Danach wurde die Säule gewaschen und anschließend DON von der Säule eluiert. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.8.1). Die Tabelle 8 zeigt, dass in einem Konzentrationsbereich von 25 bis 100 ng / ml und bei einem Aufgabevolumen von 3 bis 12 ml die Wiederfindung von DON nicht von der DON – Konzentration und dem Aufgabevolumen beeinflusst wird.

Tabelle 8: Einfluss der DON – Konzentration und des Aufgabevolumens auf die Wiederfindung von DON.

DON – Konzentration [ng / ml]	Aufgabevolumen [ml]	Wiederfindung von DON [%]
25	12	95
50	6	91
75	4	99
100	3	90

4.2.5.7 In Standardversuchen optimierte Methode

Eine DON – hältige Lösung wurde auf die Säule aufgetragen. PBS wurde sowohl als Aufgabemedium als auch als Waschmedium gewählt, das Waschvolumen betrug 5 ml. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN von der Säule eluiert. ACN wurde aus dem Eluat im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 5 ml aufgefüllt. Die Säule konnte im Standardversuch mit einer Fließgeschwindigkeit bis zu 2 ml / min betrieben werden, ohne dass eine Herabsetzung der Wiederfindung von DON beobachtet wurde. Die Bindungskapazität der hergestellten DON – IAS beträgt 1 μg DON / mg AK.

4.2.5.8 Reproduzierbarkeit der Herstellung der DON – IAS

Um die Reproduzierbarkeit der Herstellung der DON – IAS zu testen, wurde bei jeder neu hergestellten Säule die Wiederfindung von DON im Standardversuch bestimmt. Es wurden insgesamt 9 Säulen getestet, in denen jeweils 1 mg der DON – AK immobilisiert war: 3 Säulen, die an unterschiedlichen Tagen hergestellt worden waren, 2 Säulen, die an einem Tag aus dem gleichen Hydrolysat hergestellt worden waren und 4 Säulen, die an einem Tag aus 4 unterschiedlichen Hydrolysaten hergestellt worden waren (siehe Kap. 5.2.2.). Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden jeweils 5 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung auf die Säulen aufgegeben, die Säulen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gewaschen und DON mit 40 % ACN von der Säule eluiert. Die genaue Vorgangsweise bei der Bestimmung der Wiederfindung ist im Kap. 5.2.15.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Reproduzierbarkeit der Herstellung der DON – IAS.

Produktionsbatch	Wiederfindung von DON [%]
A	100
B	97
C	96
D	99
D	99
E	98
E	98
E	97
E	96

Die Herstellung der Säulen erwies sich somit als reproduzierbar. Es konnte kein Unterschied zwischen Säulen aus verschiedenen Produktionsbatches beobachtet werden. Der Mittelwert aller Wiederfindungsraten lag bei 98 %, die Standardabweichung betrug 1 %.

4.2.6 Anwendung der DON – IAS zur Aufarbeitung von Realproben

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Probenmatrizes untersucht: Weizen, Mais und Hartweizenspaghetti (siehe Kap. 5.3.1).

Es standen zwei Weizenproben zur Verfügung – ein Weizenmehl und ein DON belasteter Weizenschrot mit einer nicht genau definierten DON – Konzentration.

Bei den Maisproben handelte es sich um ein DON – kontaminiertes Maismehl mit einer geringen, nicht genau definierten DON – Belastung, und einer zertifizierten Referenzprobe mit einer genau definierten DON Konzentration. Weiters sollten kommerziell erhältliche Hartweizenspaghetti analysiert werden.

Die ersten Versuche wurden mit Weizenmehl durchgeführt.

5 g der Probe wurden eingewogen und mit 40 ml H₂O_{bd} versetzt. Die Probensuspension wurde 10 Minuten gerührt und danach etwa 20 ml der Suspension 10 Minuten bei 4 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe

einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicatifritte in eine Saugflasche filtriert. Das Filtrat wurde auf die DON – IAS aufgegeben (siehe Kap. 5.3.2). Im Weizenmehl konnte DON nicht nachgewiesen werden

Bei den ersten Versuchen, die entwickelte Methode zur Aufarbeitung der Weizenmehlprobe, welche mit einer genau definierten DON – Menge gespiket worden war (Spikebereich: 0 – 1200 µg DON / kg Probe), anzuwenden, betrug die Wiederfindung von DON nur ca. 60 %. Daher waren weitere Versuche notwendig, um die Methode im Hinblick auf eine höhere Wiederfindungsrate von DON in Realproben zu optimieren.

4.2.6.1 Optimierung der Aufgabegeschwindigkeit

Die niedrigen Wiederfindungsraten waren bei einer Aufgabegeschwindigkeit von 1,5 ml pro Minute erzielt worden. Um zu prüfen, ob die Fließgeschwindigkeit bei der Aufgabe von Probenextrakten reduziert werden muss, wurden weitere Versuche mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 bzw. 1 ml / min durchgeführt (siehe Kap. 5.2.6.1). Aus der Tabelle 10 geht hervor, dass nur die Aufgabegeschwindigkeit von 0,5 ml / min eine hohe Wiederfindung von DON ermöglichte. Daher wurden folgende Versuche, bei denen Realproben aufgearbeitet wurden, mit einer Aufgabegeschwindigkeit von 0,5 ml / min durchgeführt.

Tabelle 10: Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit von Probenextrakten auf die Wiederfindung von DON.

Aufgabegeschwindigkeit [ml / min]	Wiederfindung von DON [%]
0,5	96
1,0	84
1,5	64

4.2.6.2 Optimierung der Waschbedingungen

Bei der Extraktion von DON mit Wasser wurden auch andere wasserlösliche Substanzen aus den Realproben (Weizen und Mais) herausgelöst. Die Extrakte waren gelblich verfärbt und besaßen einen typisch mehligem Eigengeruch. Die bei der immunaffinitätschromatographischen Aufarbeitung erhaltenen Eluate waren farblos. Um die Effizienz der DON – IAS bei der Entfernung von störenden Matrixkomponenten zu demonstrieren, wurden Chromatogramme von Weizen – und Maismehlextrakten vor der Aufgabe auf die IAS aufgenommen (siehe Abbildungen 28 und 29) und mit den nach der Aufarbeitung erhaltenen Chromatogrammen (siehe Abbildungen 30 und 31) verglichen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.

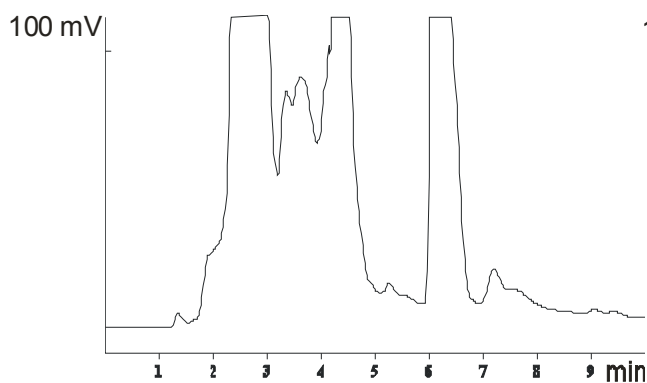


Abbildung 28: Chromatogramm eines Weizenmehlextrakts vor der IAS, (HPLC – System 1–1).

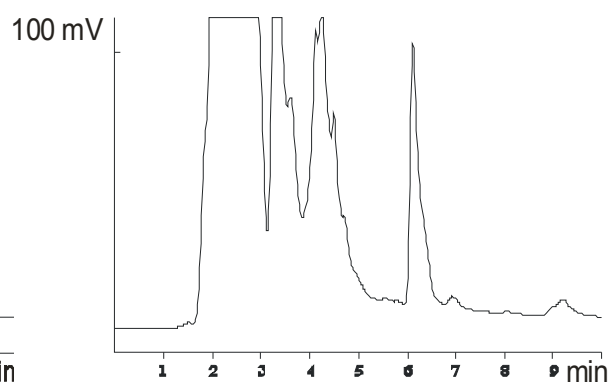


Abbildung 29: Chromatogramm eines Maismehlextrakts vor der IAS, (HPLC – System 1–1).

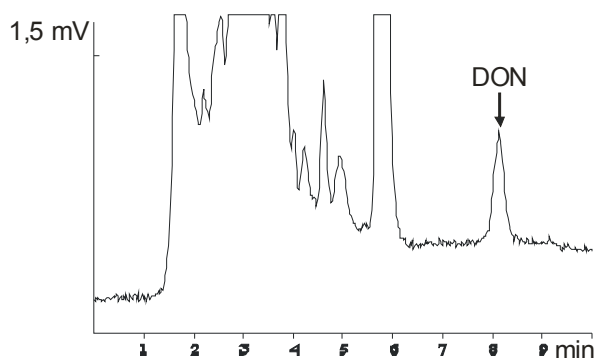


Abbildung 30: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer gespiketen Weizenmehlprobe, Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe, (HPLC – System 1–1).

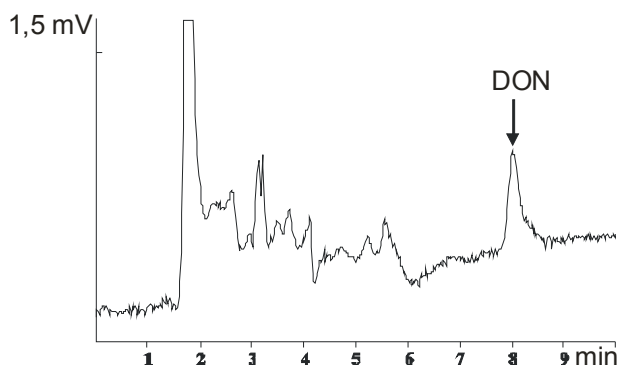


Abbildung 31: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer gespiketen Maismehlprobe, Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe, (HPLC – System 1–1).

Aus den Chromatogrammen ist ersichtlich, dass die IAC eine sehr effektive Methode zur Entfernung von Matrixkomponenten ist. Vergleicht man jedoch diese Chromatogramme mit dem Chromatogramm, das nach der Aufarbeitung mit einer kommerziell erhältlichen Immunaffinitätssäule (DONPREP) erhalten worden ist (siehe Abbildung 32), ist der Matrixanteil nach dem Aufarbeiten mit der DON – IAS immer noch relativ hoch, deshalb wurde versucht, den Waschschrift zu optimieren.

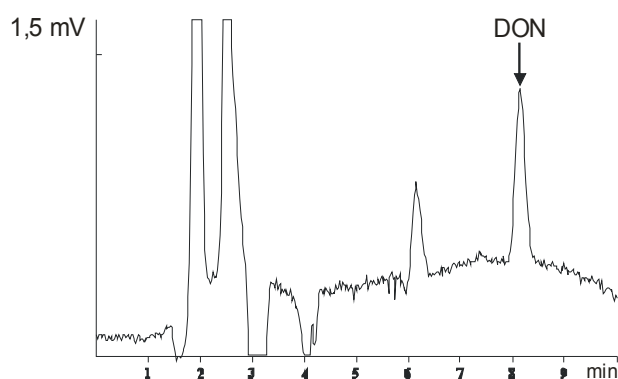


Abbildung 32: Chromatogramm eines mit einer DONPREP – Säule aufgearbeiteten Extrakts einer Weizenmehlprobe, Spikelevel 800 µg / kg, (HPLC – System 1–1).

Beim Waschen der DON – IAS mit PBS wurde beobachtet, dass PBS zusammen mit Matrixresten Schwierigkeiten bei der Messung bereitete. Daher wurden weitere

Versuche mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ durchgeführt (siehe Kap. 5.3.6). Um die Matrix effizienter zu entfernen, wurde das dreifache Volumen an Waschmedium verwendet. Die experimentellen Details sind im Kapitel 5.3.7 beschrieben. Dadurch wurde eine deutliche Matrixreduktion erzielt. Beim Vergleich des Eluats einer Sol – Gel – Säule mit dem einer DONPREP Säule ging dennoch hervor, dass in der Sol – Gel – Säule ein bedeutender Anteil der Matrix adsorbiert wird und sich dann im Eluat wieder findet. Es wurden daher unterschiedliche Detergentien zum Waschen der Säule angewendet, um eine mit DONPREP vergleichbare Matrixabtrennung zu erzielen. Es wurden im Standardversuch folgende Waschmedien getestet: 5 % Roti – Block, 1 % Triton X – 100, 1 % Tween 20, und 1 % MeOH in Wasser (siehe Kap. 5.3.8) um zu prüfen, ob die Wiederfindung von DON beeinträchtigt wird. Als erstes wurden Aliquote dieser Lösungen in das HPLC – System 1–1 injiziert, um mögliche Interferenzen mit dem DON – Peak feststellen zu können. Die erhaltenen Chromatogramme sind in den Abbildungen 33 bis 36 zu sehen.

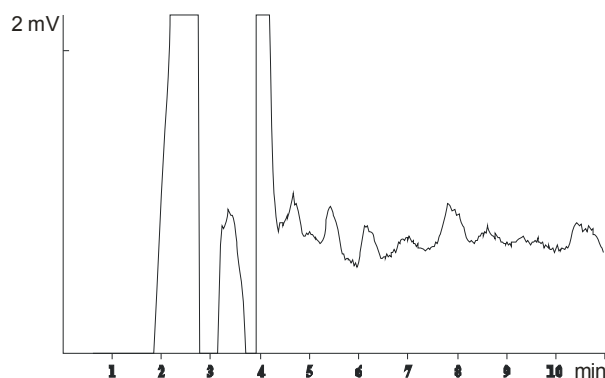


Abbildung 33: Chromatogramm einer 5 % igen Roti – Block – Lösung, (HPLC – System 1–1).

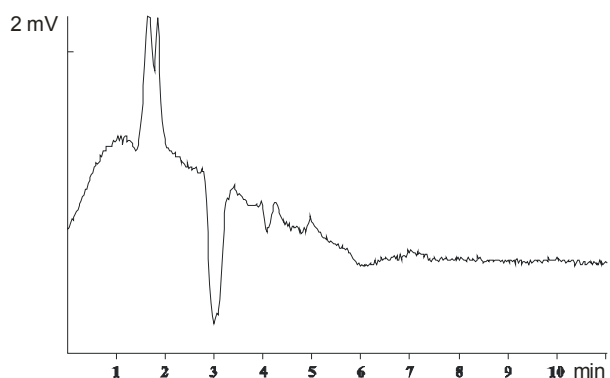


Abbildung 34: Chromatogramm einer 1 % igen Triton X–100 – Lösung, (HPLC – System 1–1).

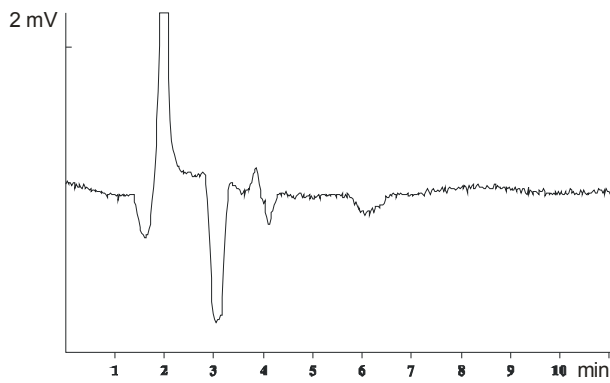


Abbildung 35: Chromatogramm einer 1 % igen Tween 20 – Lösung, (HPLC – System 1–1).

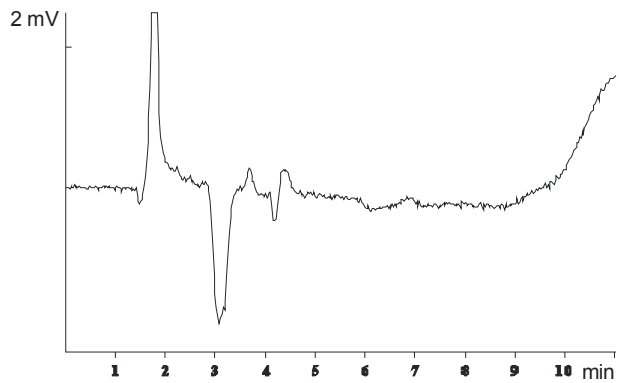


Abbildung 36: Chromatogramm einer 1 % igen MeOH – Lösung, (HPLC – System 1–1).

In den Chromatogrammen, die nach der Injektion von 1 % igem Triton X–100, 1 % igem Tween 20 und 1 % igem MeOH erhalten wurden, konnten bei der Retentionszeit von DON (7 – 8 min) keine Peaks beobachtet werden. Das Chromatogramm, das bei der Injektion der 5 % igen Roti – Block – Lösung erhalten wurde, wies dagegen mehrere Peaks auf, u.a. auch im Retentionsbereich von DON. Als nächstes wurden diese Lösungen in Standardversuchen zum Waschen der DON – IAS verwendet und der Einfluss auf die Wiederfindung von DON bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Einfluss des Waschmediums auf die Wiederfindung von DON.

Waschlösung	Wiederfindung von DON [%]
5 % Roti – Block	225
1 % Triton X – 100	35
1 % Tween 20	69
1 % MeOH	98

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass der Zusatz von Triton X – 100 und Tween 20 zur Waschlösung in der angewendeten Konzentration eluierend wirkt. Bei

Roti – Block kam es zu einer Interferenz mit dem DON – Peak und in der Folge zu einer zu hohen Wiederfindungsrate.

Im nächsten Schritt wurden die Waschlösungen bei der Aufarbeitung einer gespiketen Maisprobe (Spikelevel 400 µg / kg) getestet. Die Konzentrationen von Triton X – 100 und Tween 20 wurden um eine Zehnerpotenz herabgesetzt. Nach dem Waschen mit 10 ml dieser Waschlösungen wurde die Säule jeweils mit 5 ml H₂O_{bd} nachgewaschen, um störende Einflüsse bei der Detektion von DON zu vermeiden (siehe Kapitel 5.3.9). Die erhaltenen Wiederfindungsraten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 12: Einfluss der Waschlösung auf die Wiederfindung von DON in einer gespiketen Maisprobe (Spikelevel: 400 µg / kg).

Waschlösung	Wiederfindung von DON [%]
5 % Roti – Block	90
0,1 % Triton X – 100	26
0,1 % Tween 20	59
1 % MeOH	95

Die höchsten Wiederfindungsraten wurden erhalten, wenn 10 ml einer 1 % igen MeOH – oder einer 5 % igen Roti – Block – Lösung zum Waschen der Säule verwendet wurden. Durch ein nachfolgendes Waschen mit 5 ml Wasser konnten die durch Roti – Block verursachten Interferenzen bei der UV – Detektion von DON eliminiert werden.

Aufgrund dieser Resultate wurden MeOH und Roti – Block auch bei der Aufarbeitung einer gespiketen Weizenprobe (Spikelevel 400 µg / kg) getestet (siehe Kapitel 5.3.9). Die Wiederfindung von DON wurde abermals bestimmt, die Ergebnisse sind in der Tabelle 13 angeführt.

Tabelle 13: Einfluss der Waschlösung auf die Wiederfindung von DON in einer gespiketen Weizenprobe (Spikelevel: 400 µg / kg)

Waschlösung	Wiederfindung von DON [%]
5 % Roti – Block	111
1 % MeOH	92

Da bei diesem Versuch mit einer 5 % igen Roti – Block – Lösung eine zu hohe Wiederfindung von DON erhalten wurde, wurde in den folgenden Versuchen eine 1 % ige MeOH – Lösung zum Waschen der Säule verwendet.

Zwecks Volumen – und Zeitreduktion wurde untersucht, ob Waschen mit 5 ml 1 % igem MeOH und Nachwaschen mit 5 ml Wasser bereits zur effizienten Matrixabtrennung führen. Die Chromatogramme, die danach erhalten wurden, wurden mit Chromatogrammen verglichen, welche nach Aufarbeitung der Probe mit einer kommerziell erhältlichen Immunaффinitätssäule (DONPREP) erhalten wurden. Aus diesem Vergleich wurde ersichtlich, dass durch das Waschen mit 5 ml 1 % igem MeOH die Matrix noch nicht so gut entfernt werden konnte wie bei der DONPREP – Säule. Daher wurden weitere Versuche durchgeführt, in denen die DON – IAS mit 10 ml 1 % igem MeOH und 20 ml H₂O_{bd} gewaschen wurde. Diese Modifikation führte zu einer zufriedenstellenden Matrixabtrennung. Die Wiederfindung von DON betrug 96 % (siehe Abbildungen 37 und 38).

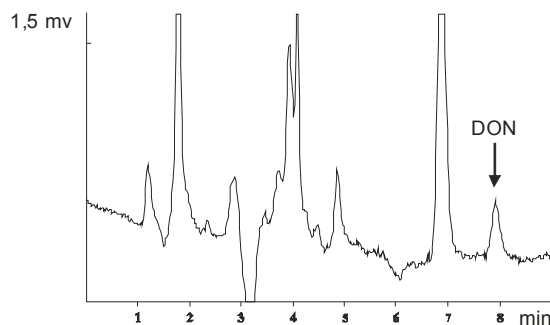


Abbildung 37: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe), IAC: Waschlösung 5 ml 1 % iges MeOH, 5 ml Wasser, (HPLC – System 1–1).

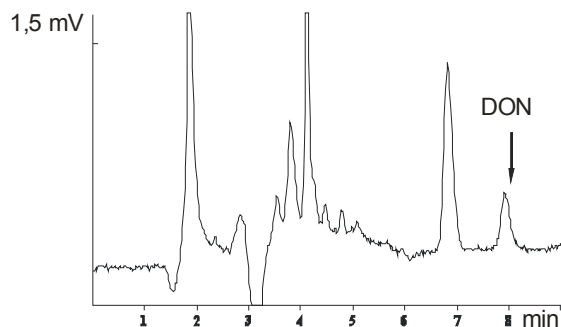


Abbildung 38: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe), IAC: Waschlösung 10 ml 1 % iges MeOH, 20 ml Wasser, (HPLC – System 1–1).

4.2.6.3 Optimierte Methode zur Aufarbeitung von Realproben

Die folgende Methode wurde zur Aufarbeitung von Realproben angewendet. 5 g einer Probe wurden eingewogen und mit 40 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicatifritte (Porosität 5) in eine Saugflasche filtriert. 5 ml des Filtrats wurden auf eine DON – IAS aufgegeben. Um sicherzustellen, dass die Bindungskapazität der Säulen auch bei stark mit DON belasteten Proben nicht überschritten wird, wurde eine DON – IAS verwendet, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren. Die Säule wurde mit 10 ml 1 % igem MeOH und anschließend mit 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gewaschen. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN von der Säule eluiert. Die Fließgeschwindigkeit während der Aufgabe des Filtrats betrug 0,5 ml / min, der Waschschrift erfolgte so schnell wie möglich und die Elution wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 ml / min durchgeführt. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Volumen des Eluats mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt.

4.2.7 Anwendung der optimierten Methode auf Realproben

4.2.7.1 Aufarbeitung einer Weizenprobe

Das Weizenmehl wurde mit der optimierten Methode aufgearbeitet und die DON – Konzentration mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt. Der Extrakt der Weizenmehlprobe hatte einen pH – Wert von 6,1, er konnte daher direkt auf die DON – IAS aufgetragen werden. Um die Wiederfindung der Methode für DON in dieser Weizenprobe zu bestimmen, wurde eine Standardaddition durchgeführt, d.h. es wurden der Probe definierte Mengen an DON zugesetzt, und diese gespiketen Proben analysiert (siehe Kap.5.3.11).

Abbildung 39 zeigt ein Chromatogramm eines aufgearbeiteten Extrakts, des mit 800 µg DON / kg Probe gespiketen Weizenmehls.

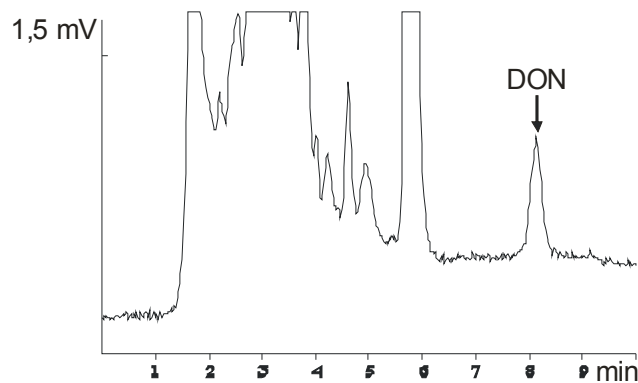


Abbildung 39: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

Das Verhältnis der Steigung der Regressionsgerade der Standardaddition und der Steigung der Kalibrierfunktion liefert die Wiederfindung der Methode (siehe Abbildung 40). So wurde für DON in Weizenmehl eine Wiederfindung von $99 \pm 4 \%$ bestimmt. Die Nachweisgrenze der entwickelten Methode ($S / N = 3$) für DON in Weizenmehl beträgt 200 µg / kg.

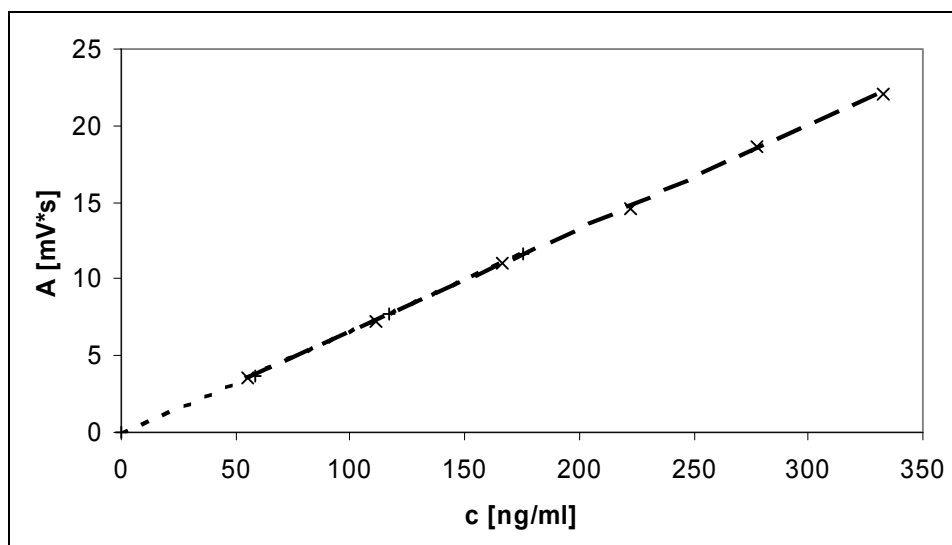


Abbildung 40: DON – Kalibrierfunktion und Regressionsgerade der Standardaddition für Weizenmehl.

Die Gleichung der bei der Standardaddition erhaltenen Regressionsgerade lautete:
 $y = 0,0665x - 0,0971$,
 der Korrelationskoeffizient betrug 0,9997.

4.2.7.2 Aufarbeitung einer Maisprobe

Das Maismehl wurde in gleicher Weise wie das Weizenmehl aufgearbeitet (siehe Kapitel 5.3.2). Der Extrakt der Maismehlprobe hatte einen pH – Wert von 6,1, er konnte daher direkt auf die DON – IAS aufgetragen werden. Auch bei dieser Probe wurde eine Standardaddition durchgeführt (Kap.5.3.11).

Abbildung 41 zeigt ein Chromatogramm eines aufgearbeiteten Extrakts der mit 800 µg DON / kg Probe gespiketen Maismehlprobe.

Bei der Analyse der ungespiketen Probe konnte DON nachgewiesen werden.

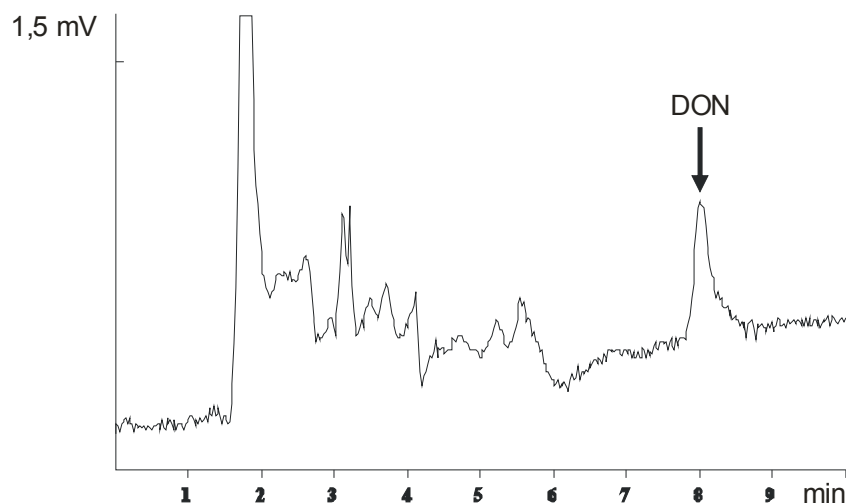


Abbildung 41: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Maismehlprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

Die Regressionsgerade der Standardaddition und die Kalibrierfunktion sind in der Abbildung 42 dargestellt. Aus dem Verhältnis der Steigungen der Regressionsgeraden der Standardaddition und der Kalibrierfunktion wurde für die Maisprobe eine Wiederfindung von DON von $85 \pm 4\%$ berechnet. Die Nachweisgrenze der Methode ($S / N = 3$) für DON in Mais beträgt 240 µg / kg.

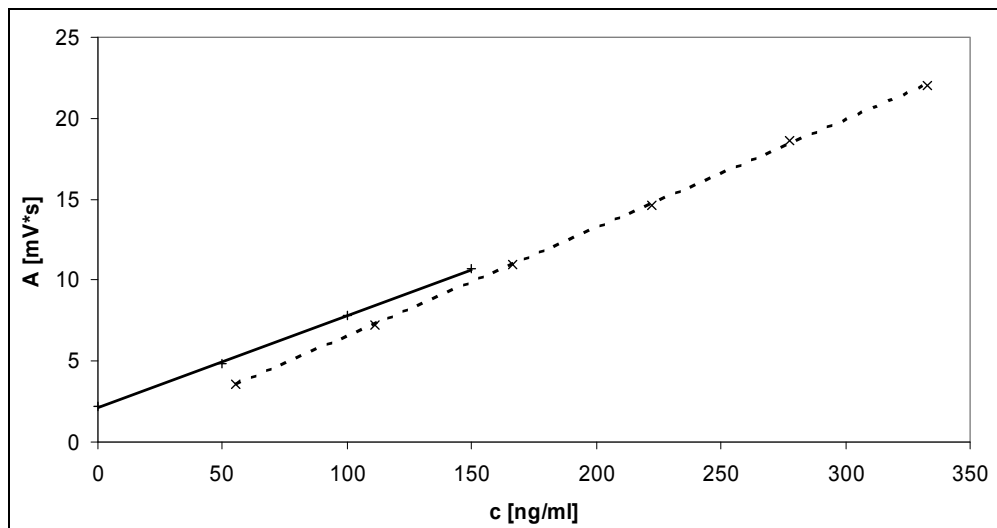


Abbildung 42. Kalibrierfunktion und Regressionsgerade der Standardaddition für eine Maismehlprobe.

Die Gleichung der bei der Standardaddition erhaltenen Regressionsgerade lautete: $y = 0,057x + 2,1043$, der Korrelationskoeffizient betrug: 0,9998.

4.2.7.3 Aufarbeitung einer Spaghettiprobe

Die Spaghetti wurden in kleine Stückchen gebrochen und mittels einer Kugelmühle fein gemahlen. Die so vorbehandelte Probe wurde in gleicher Weise behandelt wie die Weizen – und Maisproben (siehe Kap. 5.3.2). Der Extrakt hatte einen pH – Wert von 5,9, daher konnte er direkt auf die IAS aufgetragen werden.

In Abbildung 43 ist ein Chromatogramm eines aufgearbeiteten Extrakts der mit 800 µg DON / kg Probe gespiketen Spaghetti.

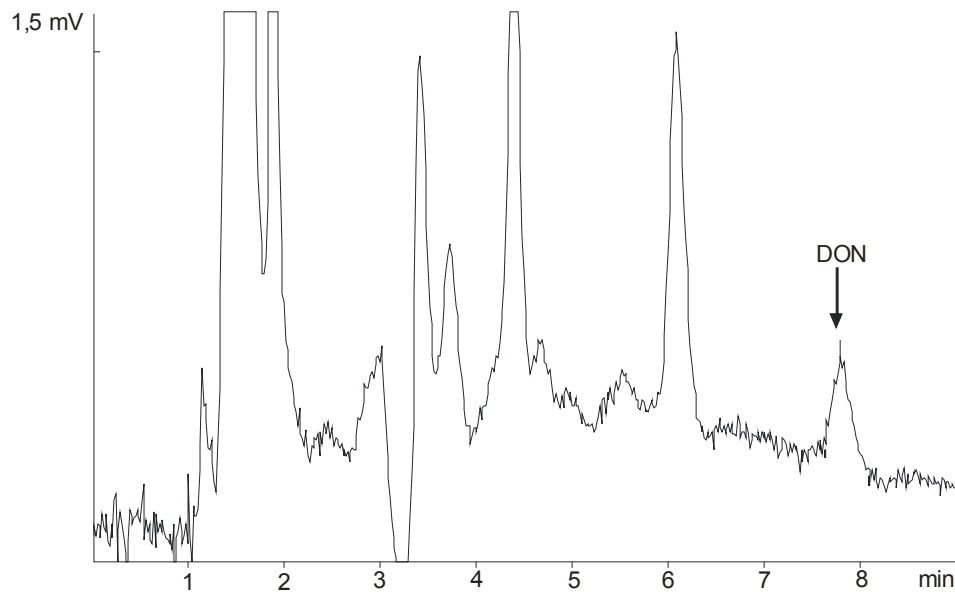


Abbildung 43: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Spaghettiprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

Die Regressionsgerade der Standardaddition und die Kalibrierfunktion sind in der Abbildung 44 dargestellt.

Die Wiederfindung von DON in Spaghetti betrug $93 \pm 8\%$, die Nachweisgrenze ($S / N = 3$) 207 µg / kg.

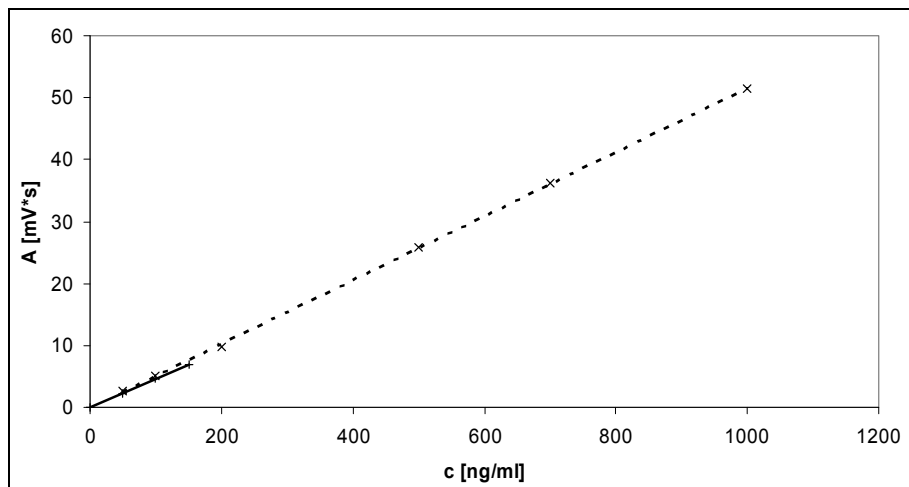


Abbildung 44: Kalibrierfunktion und Regressionsgerade der Standardaddition für eine Spaghettiprobe.

Die Gleichung der bei der Standardaddition erhaltenen Regressionsgerade lautete: $y = 0,0465x + 0,0046$, der Korrelationskoeffizient betrug 0,9997.

4.2.7.4 Validierung der Methode mit einer zertifizierten Referenzprobe

Zur Validierung der entwickelten und optimierten Methode wurde eine zertifizierte Maisprobe analysiert, die Konzentration betrug laut Hersteller $474 \pm 30 \mu\text{g DON} / \text{kg}$ Probe. Diese Probe wurde viermal extrahiert und die Extrakte wurden mit derselben Immunaффinitätssäule aufgearbeitet. In dieser Säule waren $2 \text{ mg DON} - \text{AK}$ immobilisiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 14: Bestimmung der DON – Konzentration in einer zertifizierten Maisprobe.

Extrakt:	DON Konzentration [$\mu\text{g} / \text{kg}$]
1	492
2	494
3	493
4	469
Mittelwert	487
Standardabweichung	12

Der Mittelwert der ermittelten Konzentration betrug $487 \mu\text{g DON} / \text{kg}$ Probe, die Standardabweichung $12 \mu\text{g DON} / \text{kg}$ Probe. Diese Ergebnisse stimmten sehr gut mit dem vom Hersteller angegebenen Wert überein, dadurch wurde die Richtigkeit der Methode bestätigt.

4.2.7.5 Wiederverwendbarkeit und Stabilität der DON – Immunaффinitätssäulen

Die DON – Immunaффinitätssäulen wurden nach jeder Verwendung durch Spülen mit 20 ml PBS regeneriert und danach in PBS bei 4°C gelagert. Um eine Information über die Stabilität und Wiederverwendbarkeit der Säulen zu erhalten, wurde jeweils vor der ersten Verwendung und nach einer bestimmten Zahl von aufgegebenen Proben die Wiederfindung von DON bestimmt (siehe Kap. 5.2.15). Die erhaltenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

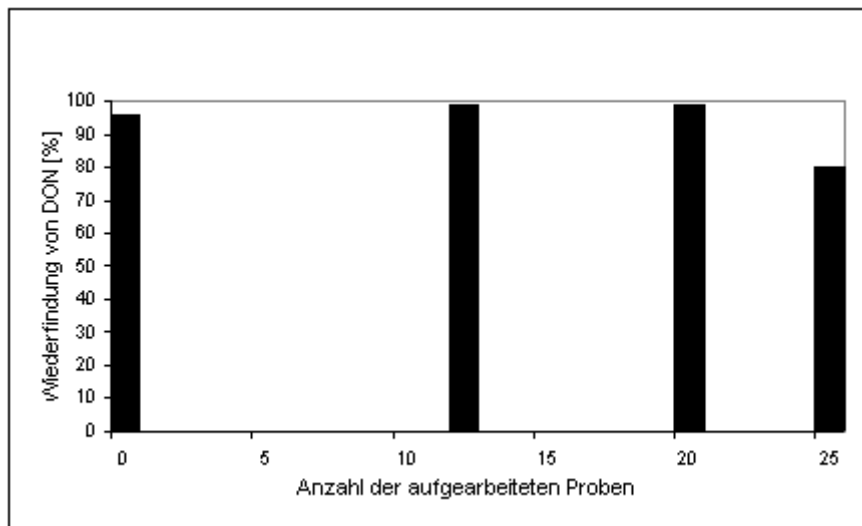


Abbildung 45: Wiederfindung von DON – IAS in Abhängigkeit von der Anzahl der aufgegebenen Proben.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Säulen bei einer sorgfältigen Regeneration und Lagerung zur Aufarbeitung von einer größeren Zahl von Realproben verwendet werden können. Etwa nach jeder zweiten aufgegebenen Realprobe war jedoch ein Umpacken der Säule notwendig, weil trotz Filtration der aufgegebenen Probenextrakte die Glasfritte in der Immunaффinitätssäule verstopft wurde. Um dieses Problem zu beseitigen, wurde in den nächsten Versuchen das Glas in leere, sorgfältig gereinigte DONPREP Säulen gepackt (siehe Kap. 5.2.3). So gepackte Säulen verstopften nicht mehr. Weiters hatten die so hergestellten Sol – Gel – Säulen den Vorteil, dass die Tropfgeschwindigkeit höher war und die Lösungen drucklos durch die Säule tropften.

Als nächstes wurde die Stabilität der Säulen in Abhängigkeit von ihrem Alter und ihrer Lagerungstemperatur getestet. Dazu wurden zwei Immunaффinitätssäulen hergestellt, in denen 2 mg DON – Antikörper immobilisiert waren (siehe Kap. 5.2.2), eine wurde bei 4 °C, die andere bei Raumtemperatur (18 – 30 °C) gelagert. Die Wiederfindung der Säulen wurde viermal in unterschiedlichen Zeitabständen getestet. Zu den jeweiligen Testzeitpunkten waren mit den Säulen 0, 10, 20 bzw. 25 Proben aufgearbeitet worden. Die Wiederfindung von DON blieb während der ersten drei Testzeitpunkte annähernd gleich hoch (über 90 %), erst nach 25 aufgearbeiteten Proben war sie unter 80 %. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Säulen weitere 19 Wochen gelagert, ohne sie zu verwenden. Nach diesen 19 Wochen wurde wieder die

Wiederfindung bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 46 und 47 zusammengefasst.

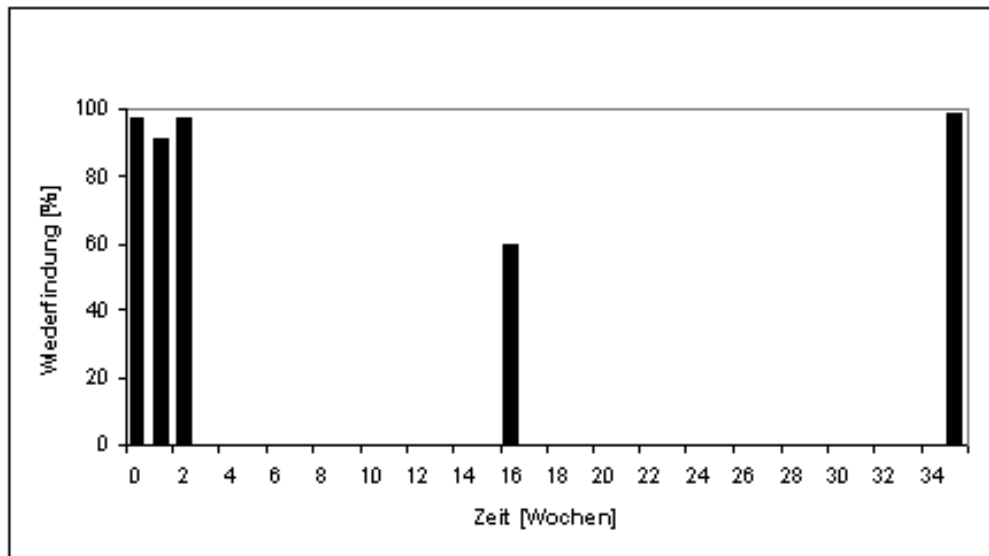


Abbildung 46: Stabilität der DON – IAS in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 4 °C in PBS.

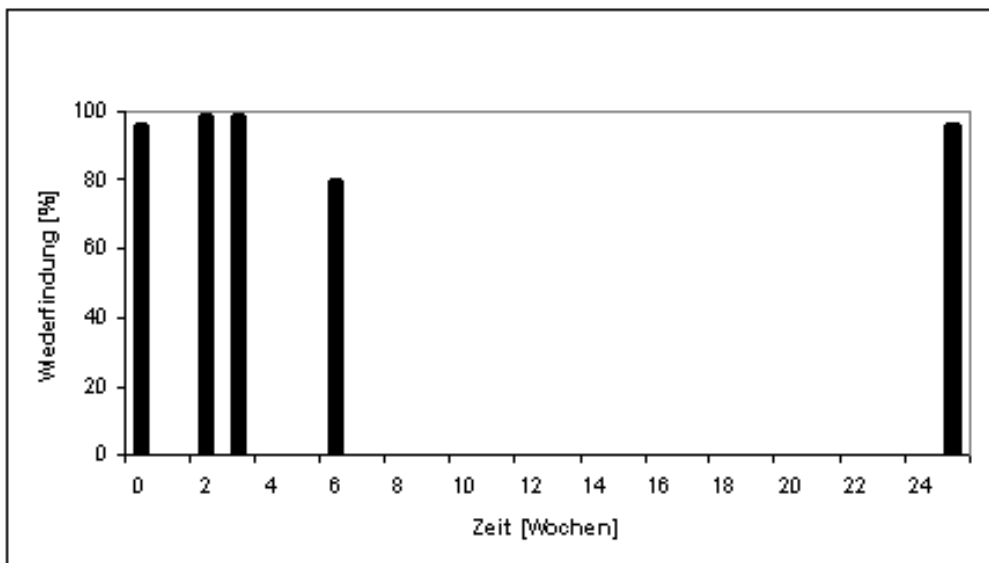


Abbildung 47: Stabilität der DON – IAS in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei Raumtemperatur in PBS.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Lagerungstemperatur keinen Einfluss auf die Stabilität der Säulen hat, sehr wohl aber die Anzahl der aufgegebenen Proben. Mit der Zahl der aufgegebenen Proben erhöht sich die Zeit, die zur Regeneration der

AK benötigt wird. So kann man sich den Anstieg der Wiederfindung bei beiden Säulen, die 19 Wochen nicht verwendet wurden und danach wieder eine hohe Wiederfindung zeigten, erklären. Daraus resultiert auch, dass die Lagerungsdauer innerhalb der untersuchten Zeit keinen Einfluss auf die Güte der Säulen hat. Dieses wurde in einem weiteren Versuch bestätigt. Es wurden zwei Säulen hergestellt und 19 Wochen bei Raumtemperatur stehen gelassen, ohne dass mit ihnen gearbeitet wurde. Nach dieser Zeit wurde die Wiederfindung beider Säulen bestimmt, sie lag für beide Säulen bei 99 %.

Eine noch längere Lagerung wurde mit drei weiteren Säulen untersucht. Diese Säulen wurden sieben Monate bei 4 °C gelagert und danach wurde bei allen drei die Wiederfindung von DON bestimmt (siehe Kap. 5.2.15.1). Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 15: Wiederfindung von DON mit 7 Monate alten DON – IAS.

Säule	Wiederfindung [%]
1	95
2	95
3	96

Aus der Tabelle 15 geht hervor, dass die DON – IAS mindestens 7 Monate bei 4 °C gelagert werden können, ohne dass es zu einer Abnahme der Wiederfindung von DON kommt.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Lagerungsdauer keinen Einfluss auf die Leistung der Säule hat.

Bei Säulen, in denen die Antikörper kovalent immobilisiert sind, ist eine längere Lagerung nur unter Zusatz eines Bakteriostatikums möglich. Dies ist bei den Sol – Gel Säulen jedoch nicht notwendig, da Mikroorganismen in die engen Poren des Glases nicht hineingelangen können und daher die Antikörper nicht abbauen können.

4.2.8 Aufarbeitung der Proben mittels kommerziell erhältlichen Immunaффinitätssäulen

4.2.8.1 Selektivität

Einige Proben wurden auch mit kommerziell erhältlichen Immunaффinitätssäulen (DONPREP) aufgearbeitet. Die Säulen wurden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet (siehe Kap. 5.3.12).

Die Chromatogramme der so aufgearbeiteten Proben sind in den Abbildungen 48, 49 und 50 dargestellt.

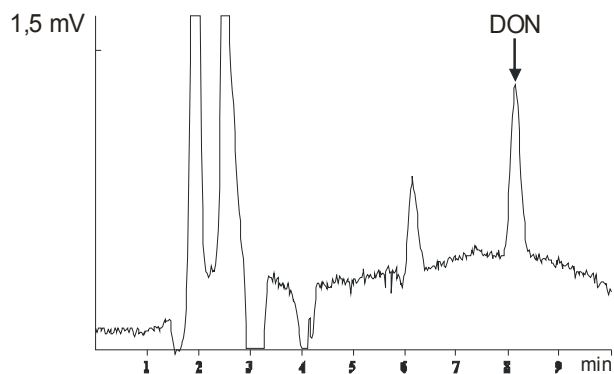


Abbildung 48: Chromatogramm eines mit der DONPREP aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

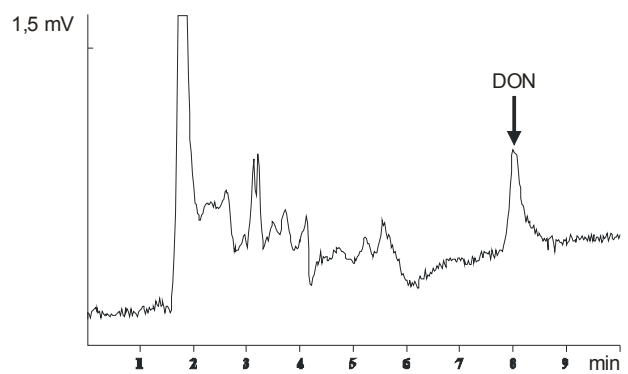


Abbildung 49: Chromatogramm eines mit der DONPREP aufgereinigten Extrakts einer Maismehlprobe (Spikelevel: 1200 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

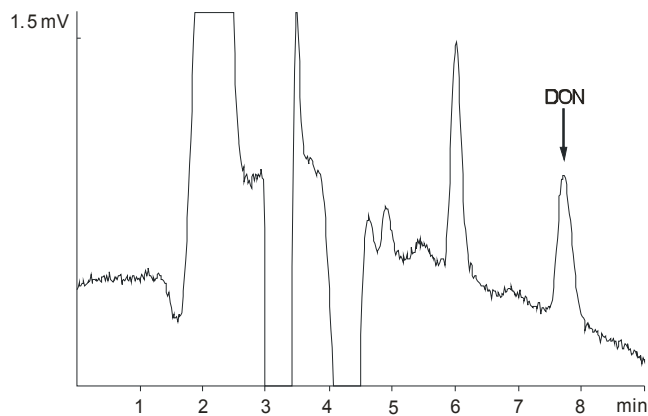


Abbildung 50: Chromatogramm eines mit der DONPREP aufgereinigten Extrakts einer Spaghettiprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

Wie aus den oben dargestellten Chromatogrammen ersichtlich ist, sind DONPREP – Säulen sehr effizient bei der Matrix – Entfernung. Bei allen aufgearbeiteten Proben lag die DON – Wiederfindung über 90 %.

Diese Chromatogramme wurden mit den Chromatogrammen der mit DON – IAS – aufgereinigten Extrakten verglichen (siehe Abbildungen 51 bis 53).

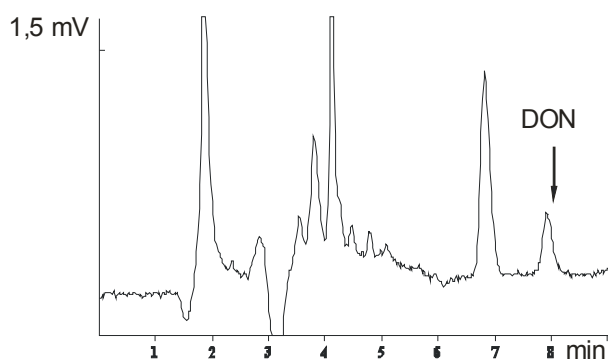


Abbildung 51: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

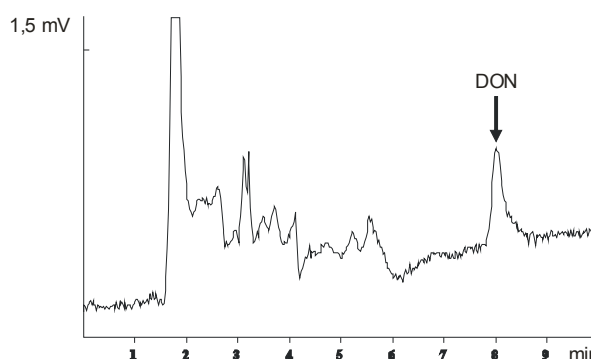


Abbildung 52: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Maismehlprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

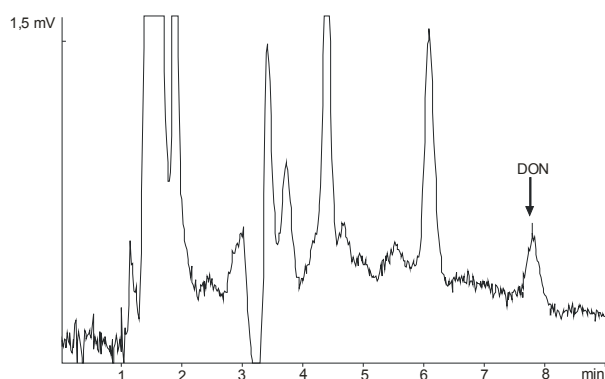


Abbildung 53: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Spaghettiprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).

Aus dem Vergleich der Chromatogramme der Abbildungen 48 bis 53 ist ersichtlich, dass sowohl mit den DONPREP – Säulen als auch mit den DON – IAS die Matrixkomponenten sehr effektiv abgetrennt werden. Bei den Abbildungen ist zu beachten, dass es bei der DONPREP – Säule zu einer Aufkonzentrierung von DON um einen Faktor zwei kommt.

4.2.8.2 Wiederverwendbarkeit der DONPREP – Säulen

Die DONPREP Säulen werden vom Hersteller als Einwegsäulen vertrieben. Die empfohlene Handhabung ist für die AK nicht schonend, garantiert aber eine effiziente Matrix – Entfernung und eine hohe Wiederfindung von DON. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob man diese IAS bei einer schonenderen Elution und einer Regeneration der Antikörper wiederverwenden kann. Dazu wurde die vom Hersteller vorgeschlagene Methode zur Anwendung der Säulen modifiziert. Die Elution von DON erfolgte mit 40 % ACN anstatt mit reinem MeOH und anschließend wurde die Säule mit PBS regeneriert (siehe Kap 5.3.13). Mit dieser Methode wurde das Weizenmehl (gespiket mit 400 µg DON / kg Probe) dreimal aufgearbeitet und die Wiederfindung von DON bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Wiederverwendbarkeit der DONPREP – Säulen.

Aufarbeitung	Wiederfindung von DON [%]
1	98
2	86
3	49

Aus der Tabelle 16 geht hervor, dass mit der modifizierten Methode bei der ersten Verwendung der Säule eine hohe Wiederfindung von DON erzielt wird. Obwohl die Säule unter den gleichen Bedingungen behandelt wurde, wie die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Sol – Gel – Säulen, ist sie im Unterschied zu den Sol – Gel – Säulen jedoch nicht geeignet, mehrmals verwendet zu werden.

4.2.9 Vergleich der Sol – Gel – IAS und der DONPREP – Säule

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Matrixabtrennung bei beiden Säulen sehr effizient war, und beide Säulen sehr hohe Wiederfindungen für DON lieferten. Die Aufarbeitungsdauer war bei den DONPREP – Säulen geringer als bei den Sol – Gel – Säulen, da die Sol – Gel – Säulen mit einer geringeren Fließgeschwindigkeit betrieben werden, das größere Säulenvolumen besitzen und dementsprechend auch größere Wasch – und Elutionsvolumina benötigen. Zur Elution wird bei den DONPREP – Säulen laut Hersteller reines Methanol verwendet, sie sind nicht wieder verwendbar. Bei den Sol – Gel – Säulen wird zur Elution 40 % Acetonitril verwendet, diese Säulen sind bis zu 20 mal wieder verwendbar.

4.2.10 Vorversuche zur Kommerzialisierung von Sol – Gel – Säulen

Es ist bekannt, dass kommerzielle DON – IAS bis zu einer DON – Konzentration von 5000 µg DON / kg Probe hohe Wiederfindungen liefern müssen. Die im Rahmen dieser Dissertation hergestellten DON – IAS (1 mg AK immobilisiert) binden im Standardversuch 1000 ng DON. Nun sollte der Einfluss der Matrix auf die Bindungskapazität untersucht werden, um bestimmen zu können, wie groß die immobilisierte Antikörpermenge sein müsste, um diesen Anforderungen zu genügen.

4.2.10.1 Überprüfung der Bindungskapazität der DON – IAS in Anwesenheit von Matrix

Die Bindungskapazität der Sol – Gel – IAS wurde in Anwesenheit von Mais getestet. Dazu wurde eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, herangezogen. 5 g einer mit DON gespiketen Maismehlprobe (Spikelevel 4000 µg DON / kg Probe) wurden mit 40 ml Wasser extrahiert. Nach der Zentrifugation und dem Filtrieren wurden 10 ml des Extrakts (≈ 5000 ng DON) auf die Säule aufgegeben. Dabei wurde die Säule überladen.

Die genaue Versuchsdurchführung ist im Kap. 5.3.3 beschrieben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: DON – Bindungskapazität bei der Aufgabe eines Maismehlextrakts.

Säule	Bindungskapazität [ng DON / mg AK]
1	546
2	669
Mittelwert	608

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, wird die Bindungskapazität der Säule in Anwesenheit von Maismatrix annähernd halbiert. Wenn an die Sol – Gel – Immunaффinitätssäulen die gleichen Anforderungen gestellt werden wie an die kommerziell erhältlichen (hohe Wiederfindungsraten bis zu einer DON Belastung von 5000 µg / kg Probe), sollten darin 2 mg der DON – Antikörper immobilisiert werden und nur 1 ml des Probenextrakts aufgetragen werden. In diesem Fall werden 625 ng DON auf die Säule, die bis zu 1000 ng DON binden könnte, aufgegeben. Bei geringer kontaminierten Proben könnte das aufgegebene Extraktvolumen auch größer sein.

4.2.11 Identifizierung von DON mittels LC / MS

Um zu überprüfen, ob es sich bei der nachgewiesenen Substanz tatsächlich um DON handelt, wurde eine LC / MS Methode entwickelt. Der Aufbau der LC / MS Apparatur und die angewendeten Bedingungen sind im Kap. 5.1.1 zusammengefasst.

Unter diesen Bedingungen wurden „Extracted Ion Chromatogramme“ (EIC) –, MS – und MS2 – Spektren einer DON – Standardlösung und der untersuchten Matrices aufgenommen.

Die folgenden Abbildungen zeigen Chromatogramme und Spektren einer DON – Standardlösung mit einer Konzentration von 2 µg / ml.

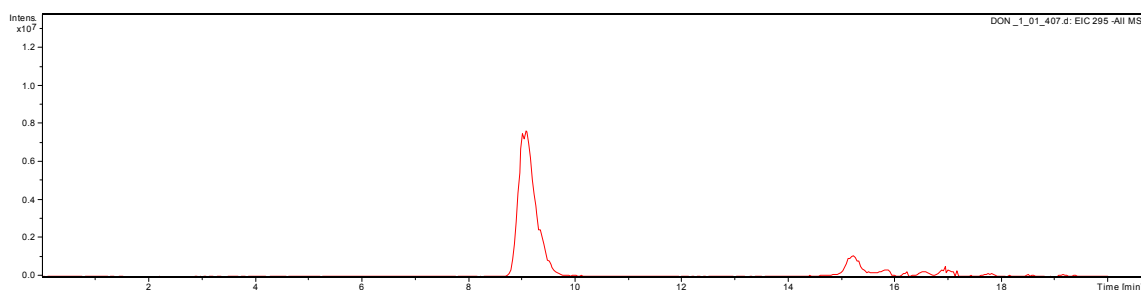


Abbildung 54: EIC (m / z = 295) einer DON – Standardlösung, 2 µg / ml in H₂O. Die Retentionszeit von DON betrug 9,2 min.

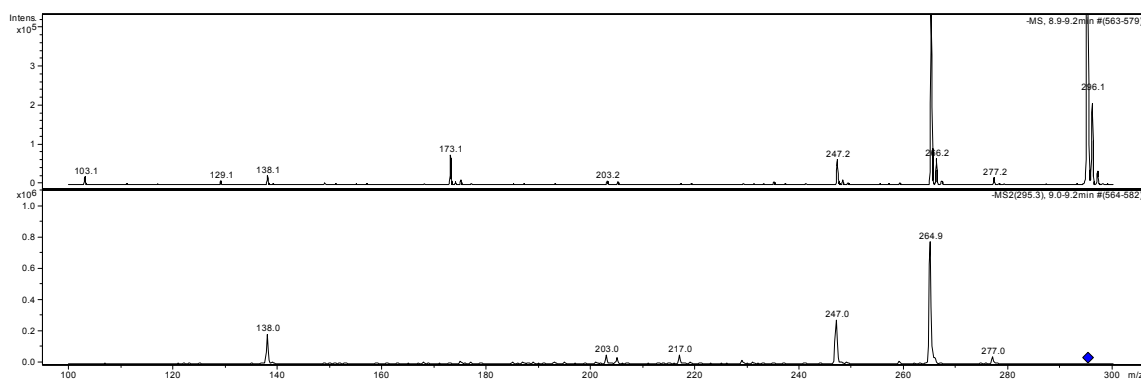


Abbildung 55: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,0 – 9,2 min) nach Injektion einer DON – Standardlösung, 2 µg / ml in H₂O.

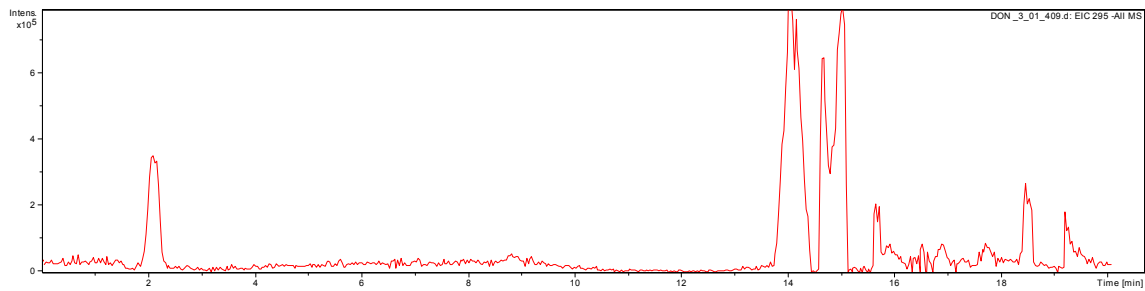


Abbildung 56: EIC ($m/z = 295$) eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Weizenmehlprobe.

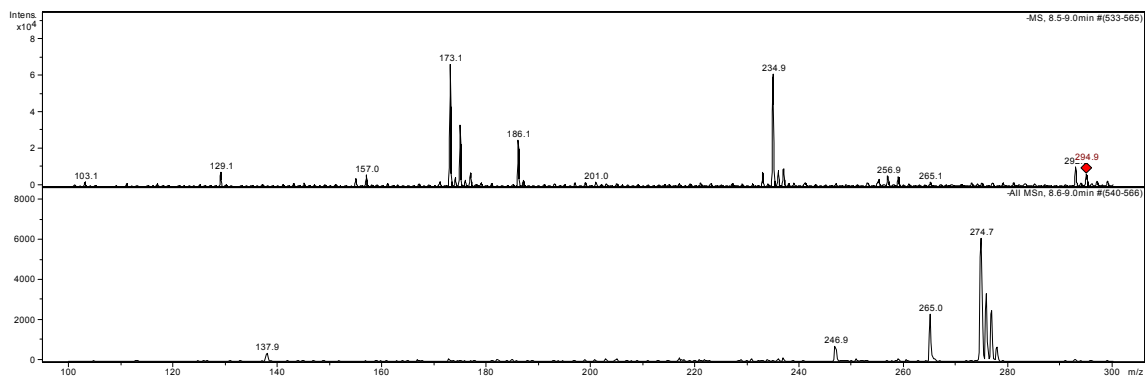


Abbildung 57: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 8,5 – 9,0 min) nach Injektion eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Weizenmehlprobe.

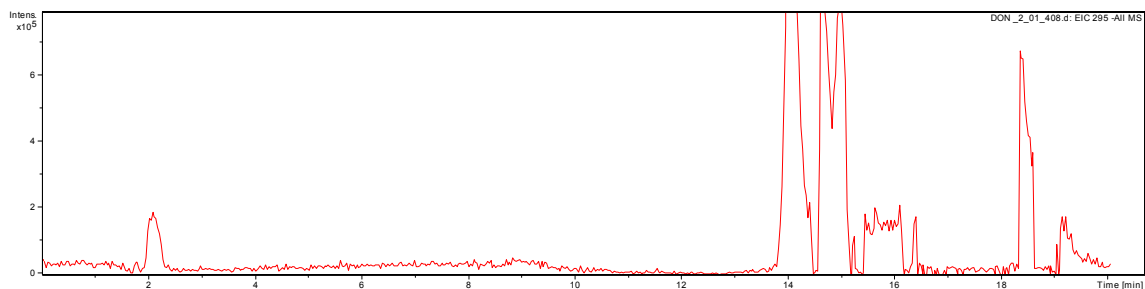


Abbildung 58: EIC ($m/z = 295$) eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Spaghettiprobe.

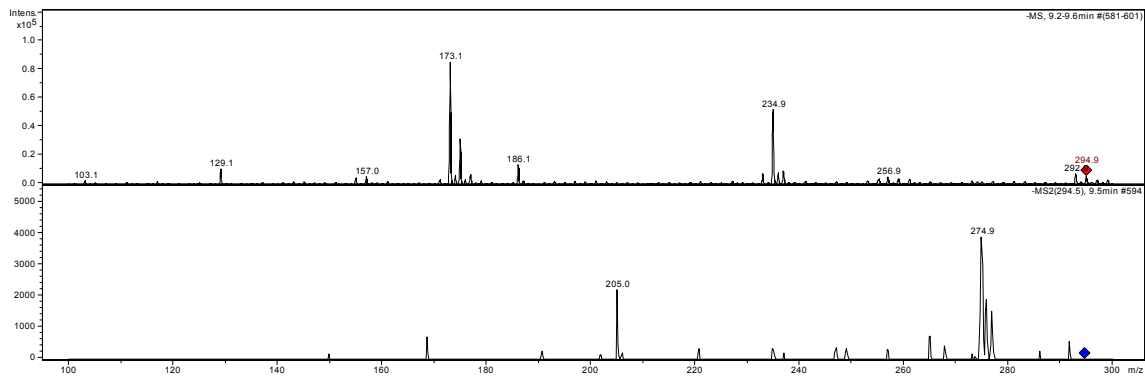


Abbildung 59: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,2 – 9,6 min) nach Injektion eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Spaghettiprobe.

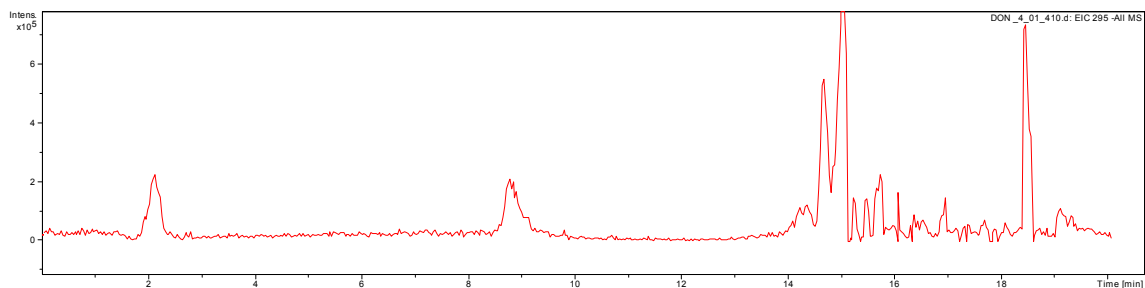


Abbildung 60: EIC ($m/z = 295$) eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich DON – kontaminierten Maismehlprobe.

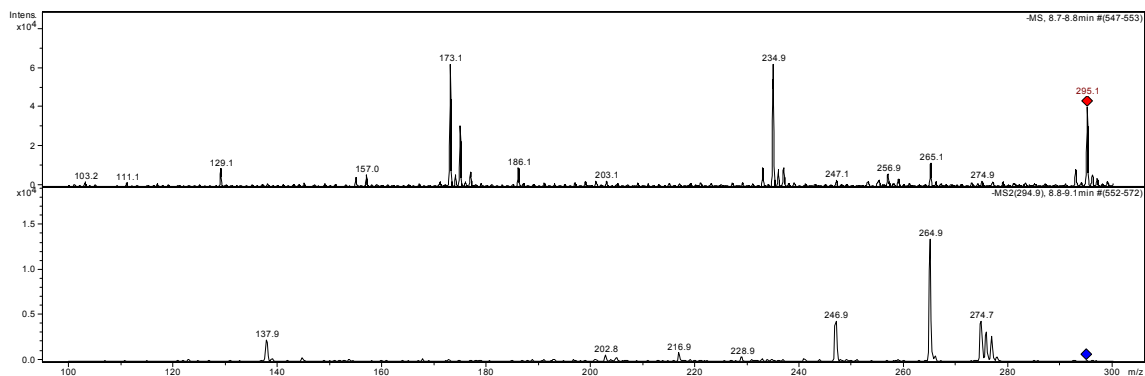


Abbildung 61: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 8,7 – 8,8 min) nach Injektion eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich DON – kontaminierten Maismehlprobe.

Aus dem Vergleich der Abbildungen 54 bis 61 geht hervor, dass die Maismehlprobe, bei der auch mit dem HPLC – System 1–1 eine DON – Belastung festgestellt wurde, im MS – und MS2 Spektrum charakteristische DON – Fragmente aufweist: zwei intensive bei m/z von 264,9 und 246,9, schwächere bei m/z von 277,0, 217,0

203,0 und 138,0. Im Weizenmehl und in der Spaghettiprobe wurde DON mittels LC / MS nicht nachgewiesen.

4.3 Voruntersuchungen mit ZON – Immunaффinitätssäulen

4.3.1 Verwendete Antikörper

Für die Versuche standen monoklonale ZON – Antikörper von zwei Klonen (Klon 1 und Klon 2) zur Verfügung. Die ersten Versuche wurden parallel mit den AK beider Klone durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde in weiterer Folge ausschließlich mit den Antikörpern des Klons 2 gearbeitet.

4.3.2 Auswahl verwendbarer Materialien – Prüfung auf Adsorption von ZON

Da aus der Literatur bekannt ist, dass ZON die Tendenz hat, unspezifisch an verschiedene Materialien zu adsorbieren, musste untersucht werden, welche Materialien bei der Analyse von ZON verwendet werden konnten. Getestet werden mussten die zur Verfügung stehenden Säulen (Glas – und Kunststoffsäulen), um eine allfällige unspezifische Adsorption von ZON im Voraus zu erkennen.

Weiters sollte festgestellt werden, welche Gefäße (aus Glas, Polycarbonat oder Polypropylen) zur Lagerung von ZON – hältigen Lösungen verwendet werden könnten.

Zum Bepacken mit Sol – Gel – Glas standen Glassäulen (Merck), gereinigte DONPREP – Säulen und andere Kunststoffsäulen zur Verfügung. In diese Säulen wurde jeweils 1 g leeres Sol – Gel – Glas (ohne immobilisierte Antikörper) gefüllt und mit einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung Durchbruchskurven für jede Säule erstellt. Es wurden jeweils 5 ml dieser Lösung auf die Säulen aufgegeben, danach

wurden die Säulen mit 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gewaschen und anschließend mit 5 ml 40 % ACN eluiert. Während der Versuche wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die ZON – Konzentration in den einzelnen Fraktionen wurde mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.5.1). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 62 bis 64 dargestellt. Die Fraktionen 1 – 5 sind die Aufgabefraktionen, die Fraktionen 6 – 10 entsprechen den Waschfraktionen, und bei den letzten 5 Fraktionen (11 – 15) handelt es sich um die Elutionsfraktionen.

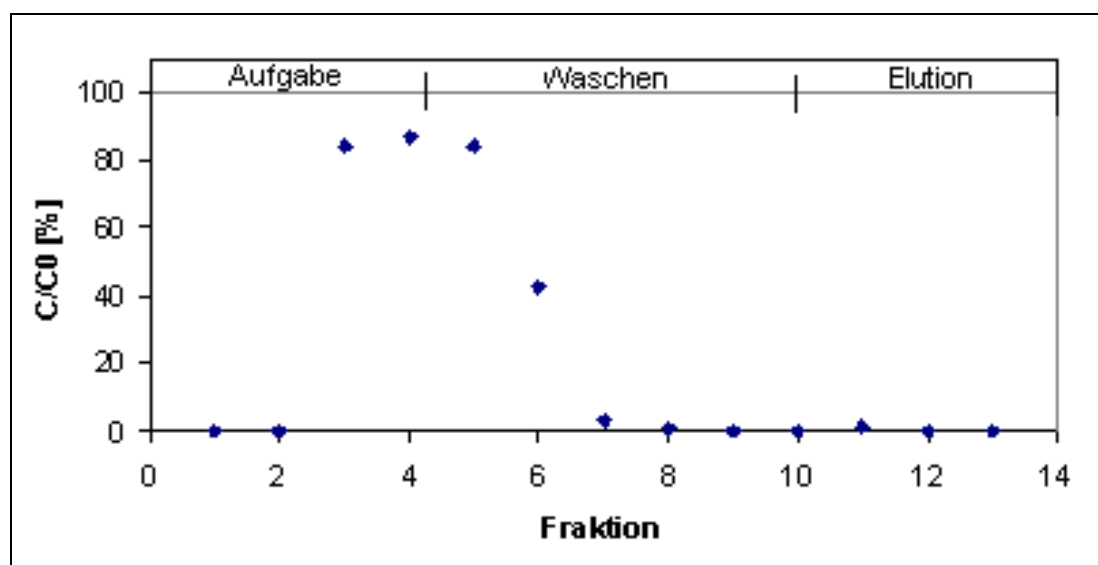


Abbildung 62: Verhalten von ZON in einer mit leerem Sol – Gel – Glas gepackten Glassäule, Fraktionsvolumen 1 ml.

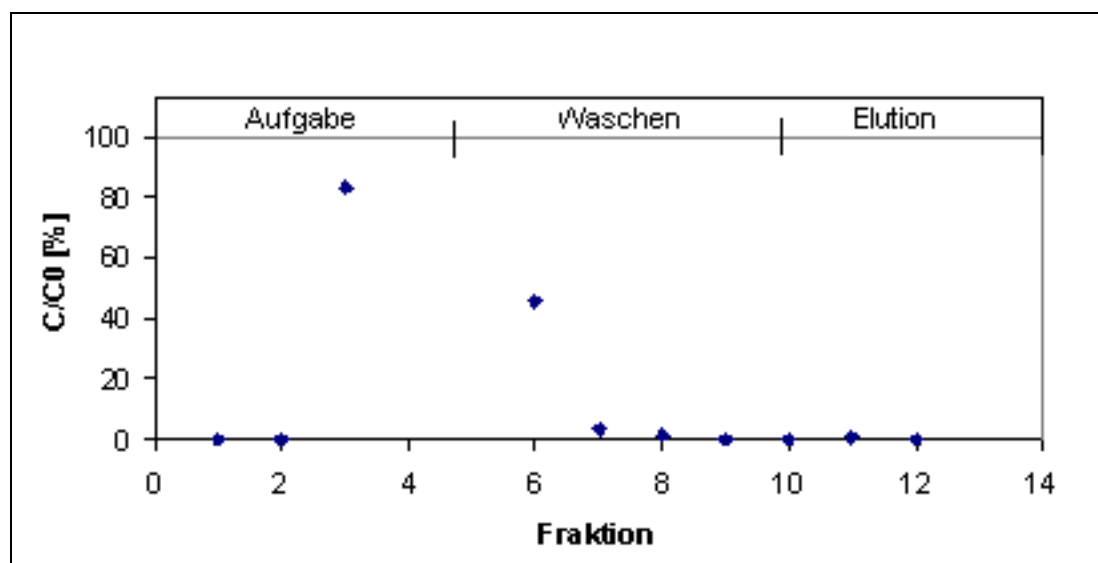


Abbildung 63: Verhalten von ZON in einer mit leerem Sol – Gel – Glas gepackten DONPREP Säule, Fraktionsvolumen 1 ml.

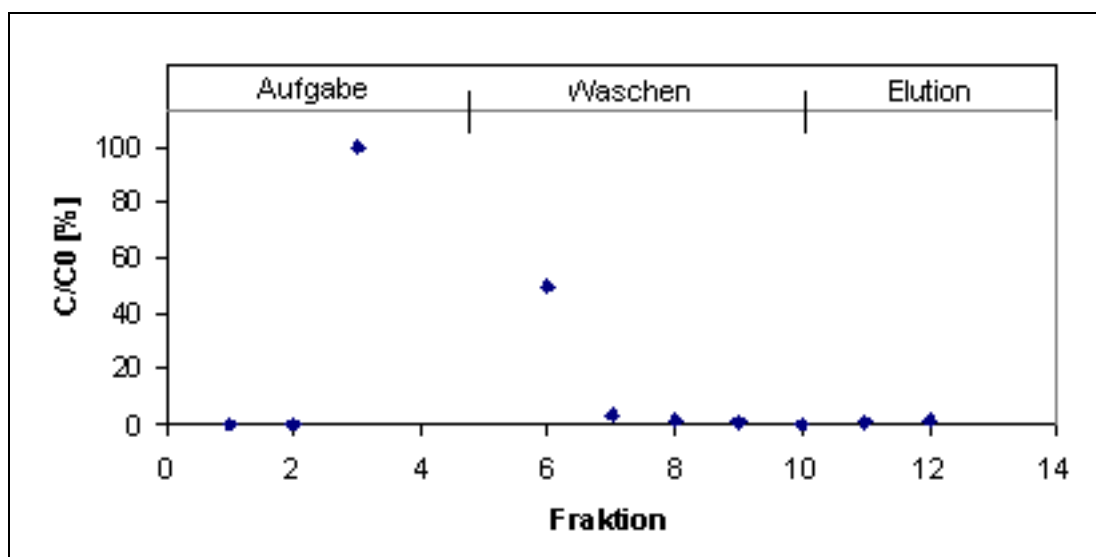


Abbildung 64: Verhalten von ZON in einer mit leerem Sol – Gel – Glas gepackten Kunststoffsäule, Fraktionsvolumen 1 ml.

Aus den Abbildungen 62 bis 64 ist ersichtlich, dass sich ZON in allen drei getesteten Säulen gleich verhielt. Es brach in der dritten Aufgabefraktion durch, beim Waschen wurde ZON vollständig von der Säule entfernt, so dass in den Eluatfraktionen ZON nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass alle drei Säulentypen zum Packen mit Sol – Gel – Glas verwendet werden konnten. Da die DONPREP und Kunststoffsäulen mit zwei Kappen verschossen und daher Platz sparend gelagert werden konnten, wurde das Sol – Gel – Glas im weiteren Verlauf dieser Arbeit in diese Säulen gepackt.

Anschließend wurde untersucht, welche Gefäße sich zur Lagerung von ZON – Standardlösungen und bei der Probenaufarbeitung anfallenden Eluaten eignen. Dazu wurden zuerst drei in unserer Arbeitsgruppe häufig verwendete Gefäße – 10 ml Messkolben aus Glas, 1,5 ml Eppendorf – Röhrchen und 20 ml Szintillationsfläschchen, die letzteren beiden aus Polypropylen, getestet. In jedes dieser Gefäße wurde jeweils die nominale Menge einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung in Wasser gefüllt und die Gefäße 2 Wochen im Kühlschrank stehen gelassen. Nach der zweiwöchigen Lagerung wurde die ZON – Konzentration der Lösungen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.5.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Wiederfindung von ZON nach einer zweiwöchigen Lagerung einer ZON – Standardlösung (Konzentration 100 ng / ml in Wasser).

Gefäß	Füllvolumen [ml]	Wiederfindung von ZON [%]
Messkolben	10	100
Eppendorf Gefäß	1,5	88
Szintillationsfläschchen	20	85

Die Tabelle 18 zeigt, dass nach einer zweiwöchigen Lagerung im Kühlschrank nur im Glasmesskolben die ursprüngliche ZON – Konzentration wieder gefunden wurde. In den beiden Polypropylengefäßen scheint es zu einer Adsorption von ZON gekommen zu sein.

Es wurde noch ein weiterer Versuch durchgeführt: sechs ZON – Standardlösungen in Wasser mit einer ZON – Konzentration im Bereich von 5 bis 100 ng / ml wurden drei Tage in Glas – bzw. in Polykarbonatröhrchen (beide mit einem Volumen von 10 ml) im Kühlschrank gelagert. Nach der dreitägigen Lagerung wurde die ZON – Konzentration mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.5.2).

In den wässrigen ZON – Standardlösungen, die in Polykarbonatröhrchen gelagert worden waren, wurden niedrigere ZON – Konzentrationen gemessen als in den Lösungen, die in Glasröhrchen gelagert worden waren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit alle ZON – hältigen Lösungen in Glasgefäßen gelagert.

4.3.3 Untersuchung der Retention von ZON in den ZON – IAS

Um sicherzugehen, dass ZON in den Immunaффinitätssäulen ausschließlich an die ZON – Antikörper gebunden wird, wurde in 1 g Sol – Gel – Glas 1 mg unspezifische Antikörper aus Kaninchen immobilisiert und in eine Säule gepackt. Die Säule wurden mit einer 100 ng / ml ZON Standardlösung in Wasser beladen. Während der Aufgabe wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und die ZON Konzentration in diesen Fraktionen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 65 wiedergegeben.

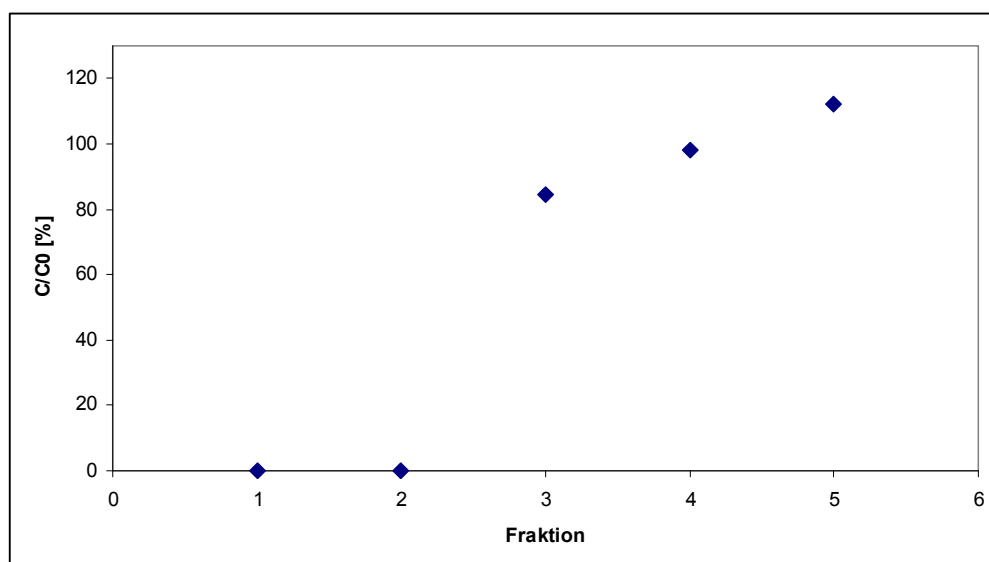


Abbildung 65: Durchbruchskurve von ZON für eine Säule, die 0,5 g Sol – Gel – Glas und 1 mg unspezifische Antikörper aus Kaninchen enthält.

Aus der Abbildung 65 ist ersichtlich, dass ZON in der Säule mit unspezifischen Antikörpern nicht retentiert wird. Der Durchbruch erfolgte bereits in der dritten Fraktion.

Weiters wurde eine Säule mit den ZON Antikörpern des Klons 2 hergestellt, dabei wurden 4,2 mg der AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert. Um die Durchbruchskurve zu erstellen, wurde die Säule mit einer 100 ng / ml ZON Standardlösung in Wasser beladen. Da kein Durchbruch von ZON beobachtet werden konnte, wurde die Säule nach der 20. Aufgabefraktion mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen und anschließend mit 5 ml 40 % ACN eluiert. Während des gesamten Versuchs wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, und die ZON Konzentration in diesen Fraktionen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.10.2). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 66 wiedergegeben. Die Fraktionen 1 – 20 sind die Aufgabefraktionen, Fraktionen 21 bis 25 sind die Waschfraktionen, denen folgen die Eluatfraktionen.

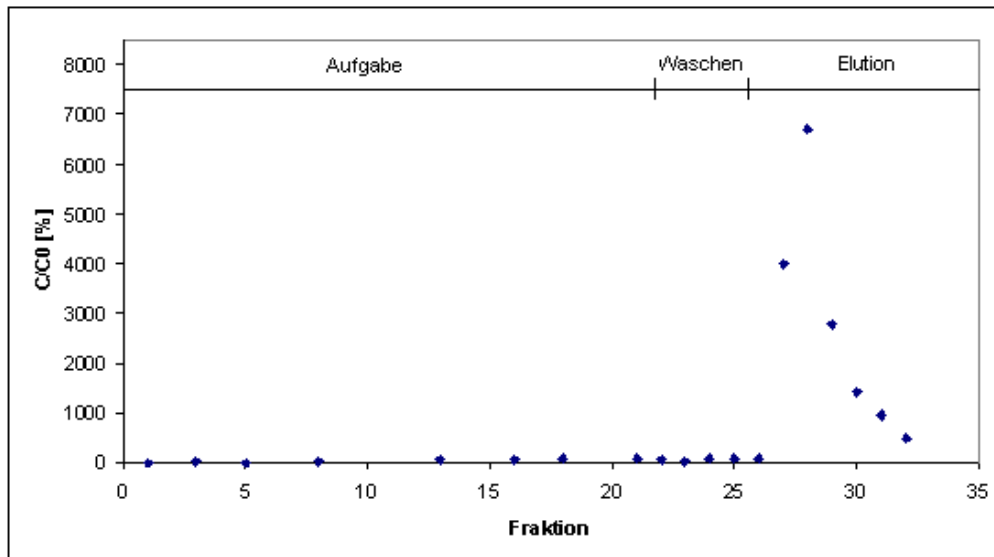


Abbildung 66: Durchbruchskurve von ZON für eine Säule, die 0,5 g Sol – Gel – Glas und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 enthielt.

Anschließend sollten noch die Antikörper des Klons 1 getestet werden. Da sich laut Hersteller die ZON – AK des Klons 1 und 2 nicht sehr in ihren Bindungskapazitäten unterscheiden, wurde bei der Herstellung von ZON – IAS mit dem AK des Klons 1 nur 0,8 mg AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas eingeschlossen. Um die Durchbruchskurve zu erstellen, wurde die Säule mit einer 100 ng / ml ZON Standardlösung in Wasser beladen. Nachdem der Durchbruch von ZON beobachtet wurde, wurde die Säule mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen und ZON anschließend mit 5 ml 40 % ACN eluiert. Während des gesamten Versuchs wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, und die ZON Konzentration in diesen Fraktionen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt (siehe Kap. 5.2.10.2)

In der Abbildung 67 sind die Ergebnisse dargestellt. Fraktionen 1 – 7 sind die Aufgabefraktionen, Fraktionen 8 bis 12 sind die Waschfraktionen, denen folgen wiederum die Eluatfraktionen.

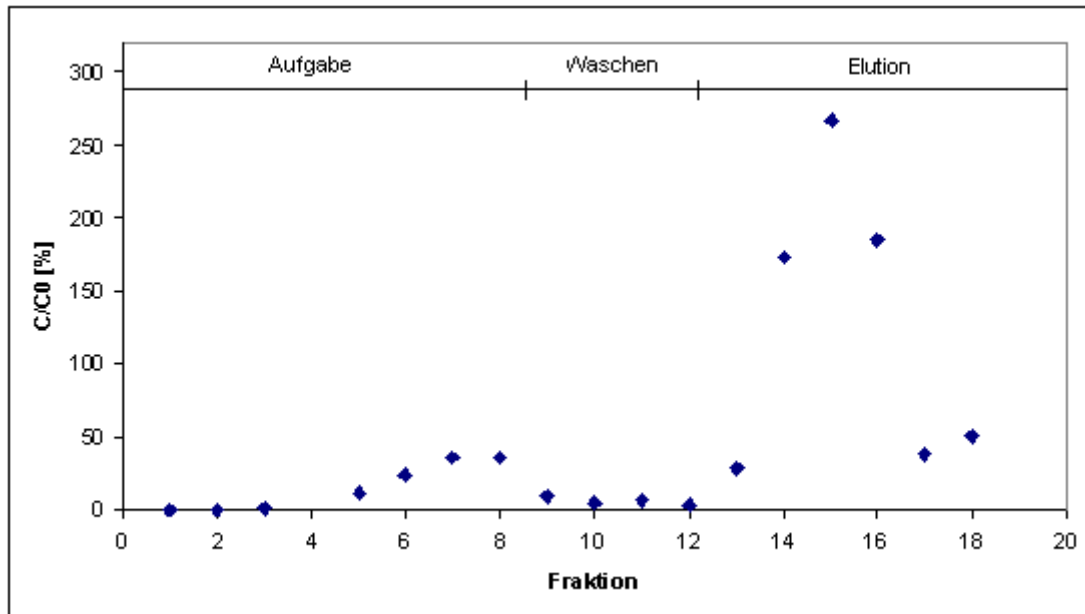


Abbildung 67: Durchbruchskurve von ZON für eine Säule, die 0,5 g Sol – Gel – Glas und 0,8 mg ZON – AK des Klons 1 enthielt.

Aus den Abbildungen 64 und 65 ist ersichtlich, dass ZON weder an unspezifische Antikörper noch an das Sol – Gel – Glas gebunden wurde.

Die Abbildungen 66 und 67 zeigen deutlich, dass ZON in den Säulen ausschließlich aufgrund einer Wechselwirkung mit den ZON – Antikörpern retentiert wird. Weiters wurde deutlich, dass sowohl Säulen mit immobilisierten Antikörpern des Klons 1 als auch Säulen mit immobilisierten Antikörpern des Klons 2 eine hohe Bindungskapazität besitzen.

4.3.4 Bestimmung der Durchbruchskapazität der ZON – IAS

In den vorigen Versuchen wurde festgestellt, dass die Antikörper beider Klone eine hohe Bindungskapazität besitzen. Um die Bindungskapazität zu bestimmen, wurden Säulen hergestellt, in denen jeweils 1,7 mg der ZON – AK immobilisiert waren (siehe Kap.5.2.2). Für diese Säulen wurden wiederum Durchbruchkurven aufgestellt. Die Säulen wurden mit einer 100 ng / ml ZON Standardlösung in Wasser beladen und dabei 1 ml Fraktionen gesammelt. Die ZON – Standardlösung wurde so lange aufgetragen, bis ein Durchbruch von ZON (10 % ZON in der Fraktion) beobachtet werden konnte (siehe Kap. 5.2.10.2). Die ZON Konzentration in diesen Fraktionen

wurde mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 68 wiedergegeben.

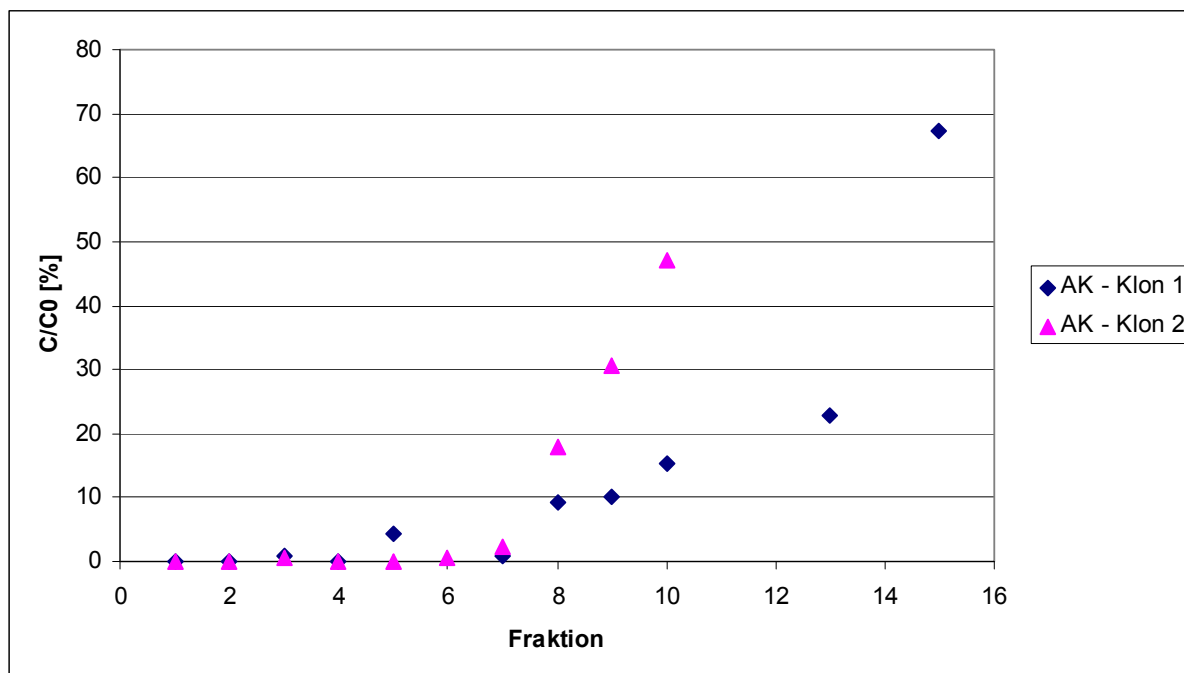


Abbildung 68: Durchbruchskurven von ZON in Säulen mit 1,7 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas, Fraktionsvolumen 1 ml, ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in Wasser.

Aus der Abbildung 68 gehen folgende Bindungskapazitäten hervor: Säulen mit 1 µg AK des Klons 1 binden 4 ng ZON und Säulen, in denen 1 µg AK des Klons 2 immobilisiert ist, binden 3,5 ng ZON.

4.3.5 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Aus der Literatur ist bekannt, dass ZON – Metabolite mit ZON – AK kreuzreagieren können. Von Prof. Razzazi – Fazeli (Veterinärmedizinische Universität Wien) haben wir eine Standardlösung erhalten, die ZON und folgende ZON – Metabolite enthielt: ZON,

α – Zearalenol (α – ZOL),

β – Zearalenol (β – ZOL),

Zearalanon (ZAN),

α – Zearalanol (α – ZAL) und

β – Zearalanol (β – ZAL), in MeOH:ACN:H₂O, 35:30:35, (v:v:v)

Die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen sind in der Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Lösung, die ZON und ZON – Metabolite enthält.

Verbindung	Konzentration [ng / ml]
ZON	15
α – ZOL	10
β – ZOL	100
ZAN	60
α – ZAL	50
β – ZAL	80

Da nur ein kleines Volumen (etwa 1 ml) dieser Standardlösung zur Verfügung stand und auch keine Einzelsubstanzen verfügbar waren, wurde geprüft, ob die ZON – Metabolite unter den angewendeten HPLC – Bedingungen von ZON getrennt werden, es wurde jedoch nicht die genaue Kreuzreaktivität in den ZON – Immunaффinitätssäulen ermittelt. In der Abbildung 69 ist das Chromatogramm der Standardlösung, die ZON und ZON – Metabolite enthält, dargestellt.

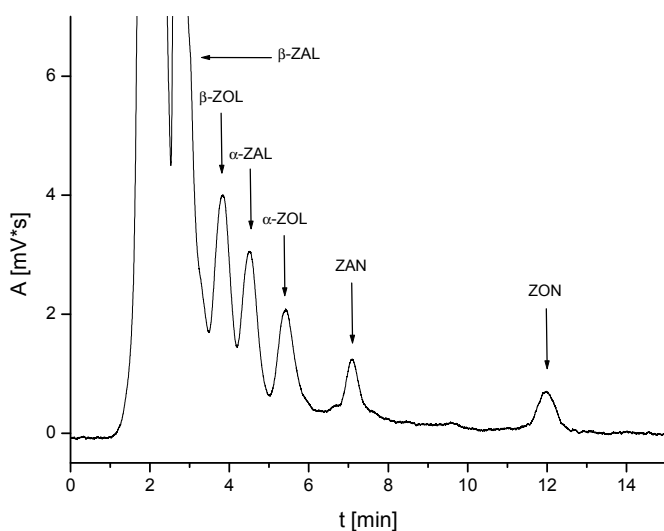


Abbildung 69: Chromatogramm einer Standardlösung, die ZON und die ZON – Metabolite enthält; Konzentration der Substanzen siehe Tabelle 19. (HPLC – System 2–2).

Aus der Abbildung 69 ist ersichtlich, dass mit der angewendeten HPLC – Methode sämtliche ZON – Metabolite von ZON getrennt werden konnten.

4.3.6 Optimierung der Operationsbedingungen

In den vorigen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Sol – Gel – Säulen, in denen ZON – AK immobilisiert wurden, ZON retentieren können. Nun sollten die Operationsbedingungen so optimiert werden, dass eine maximale Wiederfindung des Analyten erreicht und eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistet werden.

Um eine Wiederverwendbarkeit der Säule zu gewährleisten, sollen nicht allzu drastische Bedingungen angewendet werden, damit es zu keiner irreversiblen Denaturierung der Antikörper kommt.

4.3.6.1 Wahl des geeigneten Elutionsmittels

Als erstes sollte untersucht werden, mit welcher ACN – Konzentration in der Elutionslösung hohe Wiederfindungsraten erzielt werden, ohne die AK irreversibel zu denaturieren.

Es wurden ACN –Wasser Mischungen im Bereich von 40 bis 60 % ACN getestet. (siehe Kap. 5.2.9.2). Dazu wurden Säulen, die 4,2 mg Antikörper des Klons 1 bzw. des Klons 2 in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert hatten, getestet. Es wurden 5 ml einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung in H_2O_{bd} auf die Säulen aufgebracht. Die Säulen wurden mit 5 ml H_2O_{bd} gewaschen und anschließend ZON mit 10 ml des jeweiligen Elutionsmittels eluiert. Während der Elution wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die ZON – Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurden mittels des HPLC Systems 2–1 bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 70 und 71 dargestellt.

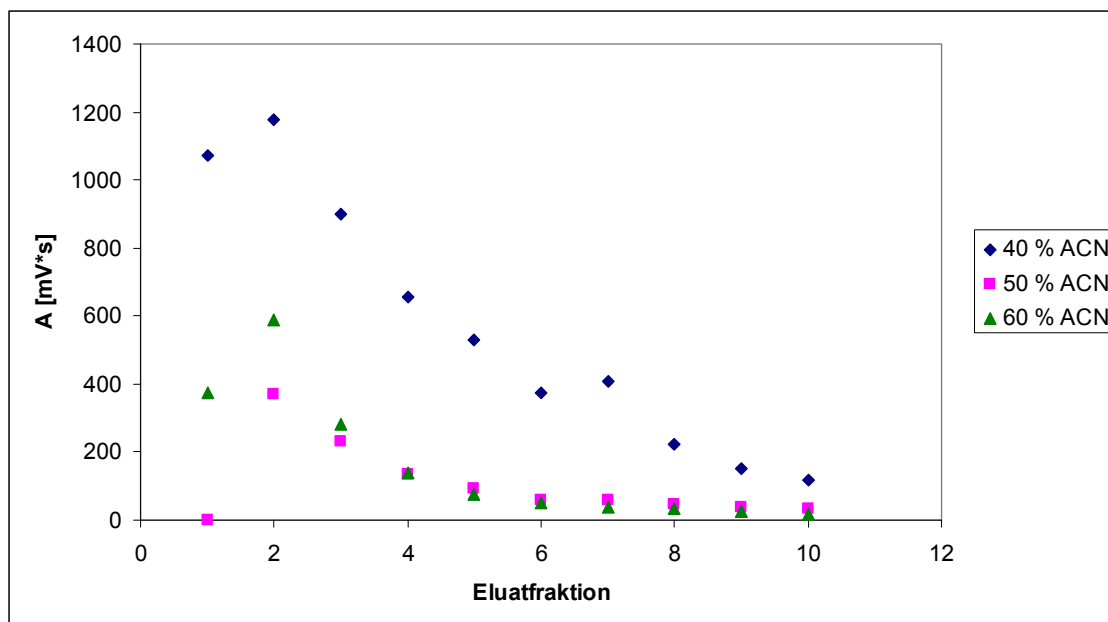


Abbildung 70: Ermittelte Peakflächen für die gesammelten Eluatfraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsmittel. Säulen mit 4,2 mg Antikörper des Klons 1, aufgegebene Standardlösung: 100 ng / ml ZON in H₂O_{bd}.

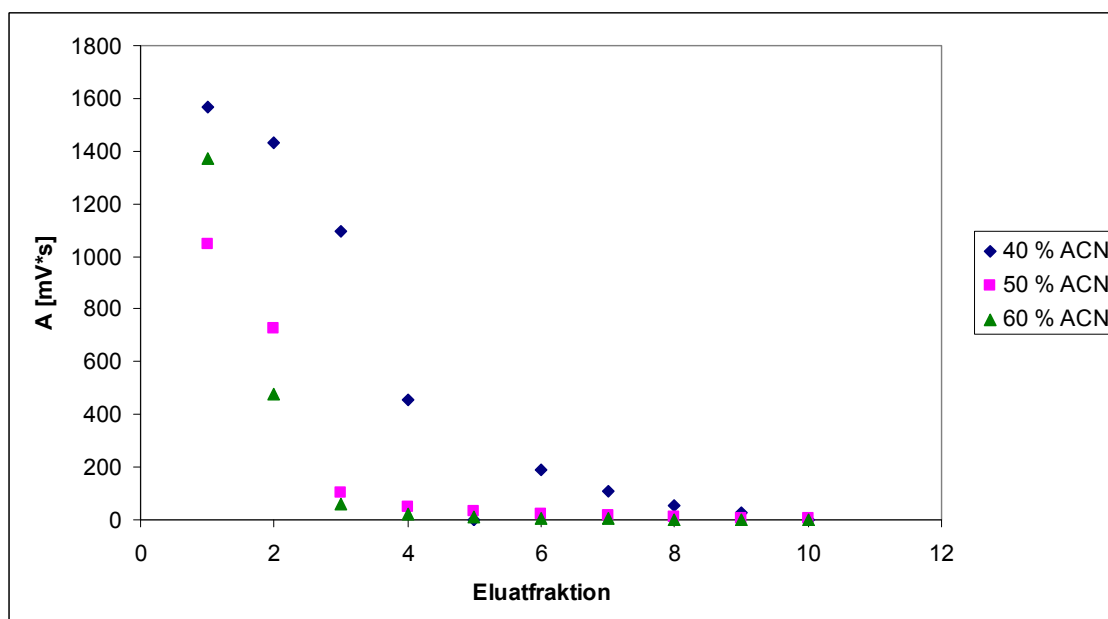


Abbildung 71: Ermittelte Peakflächen für die gesammelten Eluatfraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsmittel. Säulen mit 4,2 mg Antikörper des Klons 2, aufgegebene Standardlösung: 100 ng / ml ZON in H₂O_{bd}.

Für jedes Elutionsmittel wurde die Gesamtwiederfindung von ZON berechnet. In der Tabelle 20 sind für jedes Elutionsmittel und für beide Säulen die Elutionsvolumina

angegeben, die benötigt wurden, um mehr als 90 % der aufgegebenen ZON – Menge zu eluieren.

Tabelle 20: Benötigtes Elutionsvolumen, um eine Wiederfindung von ZON > 90 % zu erreichen.

AK – Klon	Elutionsmittel	Elutionsvolumen [ml]
1	40% ACN	8
1	50% ACN	8
1	60% ACN	7
2	40% ACN	6
2	50% ACN	3
2	60% ACN	3

Die Versuche, bei denen die ACN – Konzentration im Elutionsmittel 50 bzw. 60 % betrug, wurden mit der gleichen Säule wiederholt, um zu prüfen, ob die relativ hohe ACN – Konzentration nicht zu einer irreversiblen Denaturierung der AK geführt hat. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 21 angeführt.

Tabelle 21: Überprüfung der Vollständigkeit der Elution und der Wiederverwendbarkeit der ZON – IAS.

AK – Klon	Elutionsmittel	1. Versuch – Wiederfindung [%]	2. Versuch – Wiederfindung [%]
1	40% ACN	83	–
1	50% ACN	78	82
1	60% ACN	95	98
2	40% ACN	89	–
2	50% ACN	102	98
2	60% ACN	100	97

–.....Versuch wurde nicht durchgeführt

Aus den Abbildungen 70 und 71 und der Tabelle 20 geht hervor, dass der mit dem AK des Klons 2 gebildete AG – AK – Komplex bei einer geringeren ACN – Konzentration dissoziiert als der mit dem AK des Klons 1 gebildete Komplex. Ab einer ACN – Konzentration von 50 % ist ein Volumen von 3 ml ausreichend, um ZON vollständig zu eluieren. Tabelle 21 zeigt, dass im Fall der Antikörper des Klons 1

ZON erst ab einer ACN – Konzentration von 60 % vollständig eluiert werden konnte, im Fall der Antikörper des Klons 2 bereits ab einer ACN – Konzentration von 50 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Versuche mit den Antikörpern des Klons 2 durchgeführt. Außerdem haben diese Versuche gezeigt, dass die Elution mit 50 % ACN nicht zu einer Denaturierung der AK des Klons 2 führt.

4.3.6.2 Wahl eines geeigneten Aufgabemediums

Da aus der Literatur bekannt war [Sulyok et al., 2006], dass die Extraktion von ZON aus Realproben mit einer höher konzentrierten ACN – Lösung (ACN – Konzentration ≥ 70 %) die höchsten Wiederfindungsraten liefert, musste der Einfluss der ACN – Konzentration im Aufgabemedium auf die Wiederfindung von ZON untersucht werden. Dazu wurden auf die ZON – IAS, in der 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, ZON – Standardlösungen mit einer ZON – Konzentration von 100 ng / ml in 10 % und 20 % ACN aufgegeben. Zum Vergleich wurden auch ZON – Standardlösungen mit derselben Konzentration in Wasser und PBS aufgegeben (siehe Kap. 5.2.11.2 und 5.2.15.2). Die Wiederfindungsraten für ZON sind in der Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Einfluss des Aufgabemediums auf die Wiederfindung von ZON.

Aufgabemedium	Wiederfindung von ZON [%]
Wasser	90
PBS	92
10 % ACN	94
20 % ACN	86

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass das Aufgeben einer ZON – Standardlösung mit einer ACN – Konzentration von 10 % zu keiner Reduktion der Wiederfindung von ZON führt. Hingegen führt eine ACN – Konzentration von 20 % zu einer Reduktion der Wiederfindung.

4.3.6.3 Einfluss des pH – Wertes der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von ZON

Um zu prüfen, in welchem Bereich sich der pH – Wert der aufzugebenden Lösung bewegen darf, damit es zu einer vollständigen Retention von ZON in den IAS kommt, wurden ZON – Standardlösungen mit einer Konzentration von 100 ng / ml in PBS in einem pH – Bereich von 5 bis 8 auf die IAS aufgetragen. In den Säulchen waren je 4,2 mg ZON – AK immobilisiert (siehe Kap. 5.2.12.2). Danach wurden die Säulen gewaschen, ZON von den Säulen eluiert und anschließend die ZON – Konzentration im Eluat mittels des HPLC – Systems 2–2 bestimmt (siehe Kap. 5.2.15.2).

Bei allen anderen im Rahmen der Dissertation durchgeführten Versuchen zur Bestimmung der Wiederfindung wurde auch die auf die IAS aufgegebene Standardlösung in das jeweilige HPLC – System injiziert und die für das Eluat ermittelte Konzentration auf die Standardlösung bezogen. Bei dieser Versuchsreihe war dies nicht möglich, da mit steigendem pH – Wert der Aufgabelösung Quencheffekte und eine kürzere Retentionszeit von ZON beobachtet wurden. Dies ist in den Abbildungen 72 bis 75 dargestellt.

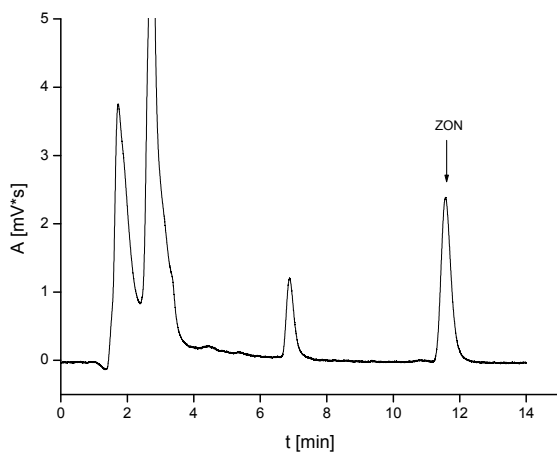


Abbildung 72: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 5, (HPLC – System 2-2).

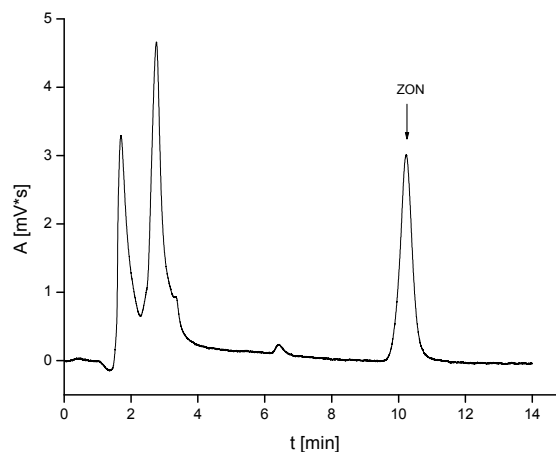


Abbildung 73: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 6, (HPLC – System 2-2).

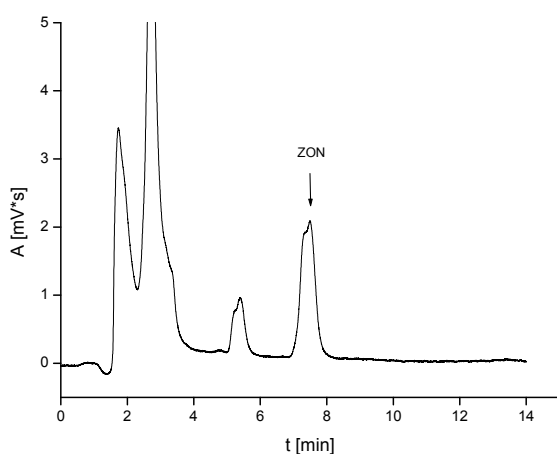


Abbildung 74: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 7, (HPLC – System 2-2).

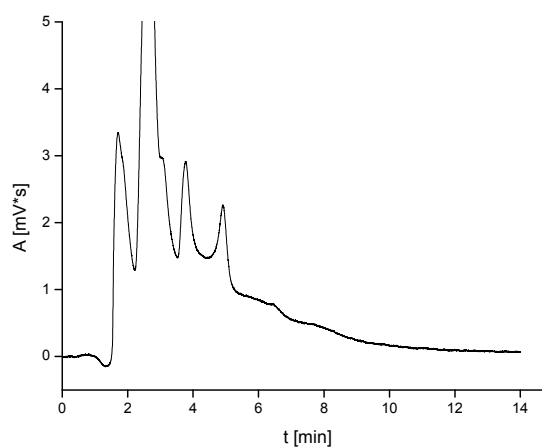


Abbildung 75: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 8, (HPLC – System 2-2).

Bei der Wiederfindungsberechnung wurden die Ergebnisse auf eine durchschnittliche 100 ng / ml ZON Standardlösung bezogen.

Die Wiederfindungsraten sind in der Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Einfluss des pH – Werts der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von ZON.

pH –Wert	Wiederfindung von ZON [%]
5	88
6	92
7	95
8	92

Aus der Tabelle 23 geht hervor, dass der pH – Wert der Aufgabelösung im untersuchten Bereich keinen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindung von ZON hat.

4.3.6.4 Wahl eines geeigneten Waschmediums

Im Hinblick auf eine möglichst vollständige Matrixentfernung beim Aufarbeiten von Realproben wurde als nächstes getestet, wie hoch die MeOH – Konzentration in der Waschlösung sein darf, ohne die Wechselwirkungen zwischen ZON und den ZON – Antikörpern zu beeinträchtigen. Methanol wurde deshalb als Waschmedium gewählt, weil sich in den Versuchen mit den DON – Immunaффinitätssäulen gezeigt hatte, dass eine niedrige Konzentration von MeOH im Gegensatz zu ACN nicht eluierend wirkt (siehe Kap. 4.2.5.4 und 4.2.6.2). Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit sowohl DON – als auch ZON – Antikörper in eine Säule gepackt werden sollten, musste geprüft werden, ob geringe MeOH Konzentrationen auch auf die ZON – AK nicht eluierend wirken, denn dann könnte sich eine MeOH – Wassermischung auch bei den DON / ZON – Immunaффinitätssäulen als geeignetes Waschmedium erweisen.

Um den Einfluss der MeOH – Konzentration in der Waschlösung auf die Wiederfindung von ZON zu prüfen, wurden 5 ml einer 50 ng / ml ZON – Standardlösung in Wasser auf eine Säule aufgetragen, in der 2,5 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Es wurden 5 unterschiedliche MeOH – Wassermischungen mit den Konzentrationen 0, 10, 20 30 und 40 % MeOH als Waschmedium eingesetzt (siehe Kap. 5.2.7). ZON wurde mit 50 % ACN von der

Säule eluiert und die ZON – Konzentration mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 76 zusammengefasst.

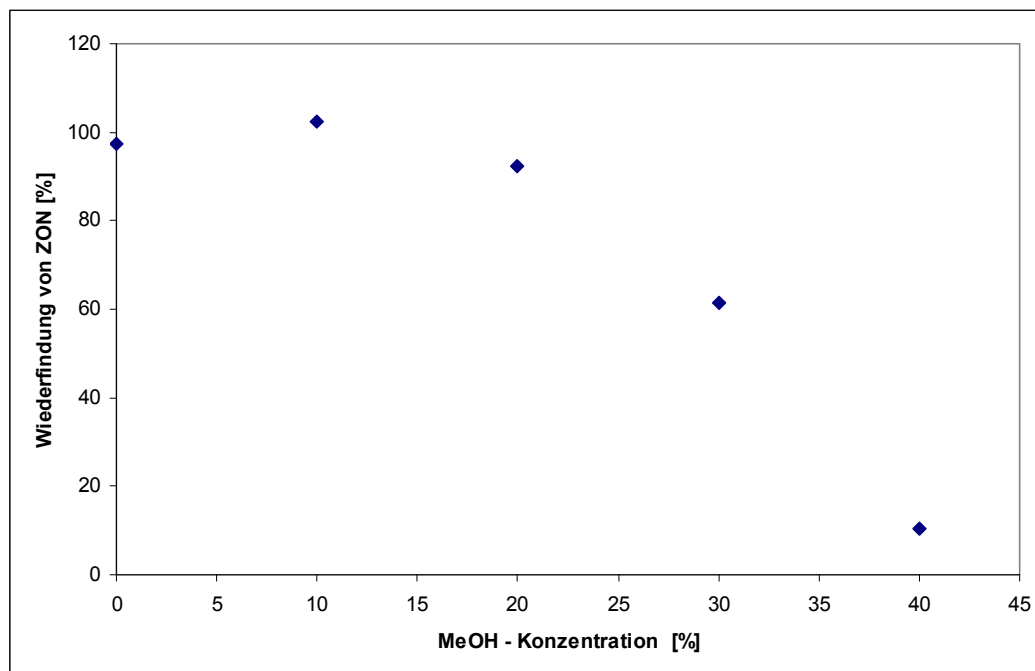


Abbildung 76: Einfluss der MeOH – Konzentration in der Waschlösung auf die Wiederfindung von ZON. ZON – IAS mit 2,5 mg Antikörper des Klons 2.

Aus der Abbildung 76 geht hervor, dass eine 10 % ige MeOH Lösung das optimale Waschmedium ist, da die Wiederfindung von ZON nicht beeinträchtigt wurde. Methanolkonzentrationen ≥ 20 % führten zu einer drastischen Abnahme der Wiederfindung von ZON.

4.3.6.5 Einfluss des Aufgabevolumens und der ZON – Konzentration auf die Wiederfindung von ZON

Aus der Literatur ist bekannt, dass zur ZON – Extraktion aus den Realproben üblicherweise höher konzentrierte ACN – Wasser Mischungen (≥ 70 %) verwendet werden. [Sulyok et al., 2006] Da solche ACN – Konzentrationen die Wechselwirkung zwischen ZON und den AK beeinträchtigen können, muss der Extrakt vor dem Aufgeben auf die Säule entweder verdünnt oder das Acetonitril z.B. durch Wegblasen im Stickstoffstrom entfernt werden. Der Nachteil beim Verdünnen des Extrakts ist, dass unter Umständen ein großes Volumen erhalten wird, und es dadurch zu einem Durchbruch des Analyten in der Säule kommen könnte. Es galt

daher zu überprüfen, ob das Aufgabevolumen und die ZON – Konzentration in der Aufgabelösung die Wiederfindung von ZON beeinflussen.

Die Details zur Versuchsdurchführung sind im Kap. 5.2.8.2 beschrieben. Es wurde eine Säule, in der 2,5 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren, mit jeweils 500 ng ZON beladen, die in 1, 2, 5 bzw. 20 ml enthalten waren. Dadurch war auch die ZON Konzentration in der jeweiligen Aufgabelösung festgelegt, sie betrug 500, 250, 100 bzw. 25 ng / ml. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml PBS gewaschen und ZON mit 4 ml einer 50 % ACN – Lösung von der Säule eluiert. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 2–2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 77 dargestellt.

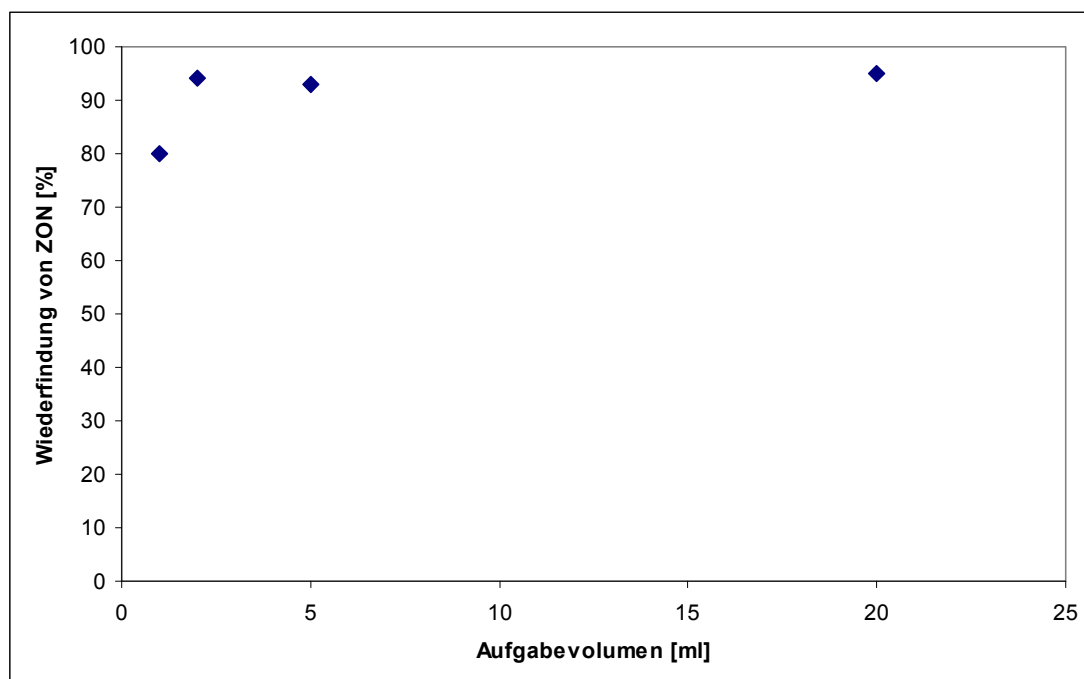


Abbildung 77: Wiederfindung von ZON in Abhängigkeit vom Aufgabevolumen. ZON – IAS mit 2,5 mg Antikörper des Klons 2.

Aus der Abbildung 77 ist ersichtlich, dass ein Aufgabevolumen bis zu 20 ml keine Reduktion der Wiederfindung von ZON mit sich bringt. Bei einem kleineren Aufgabevolumen von 1 ml betrug die Wiederfindung von ZON nur 80 %, wahrscheinlich aufgrund der relativ langsamen Kinetik der AG – AK – Reaktion.

4.3.6.6 Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von ZON

Eine hohe Fließgeschwindigkeit kann aufgrund der langsamen Kinetik der AG – AK – Reaktion einen Einfluss auf die Wiederfindung des Analyten haben. Um den Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Wiederfindung von ZON zu prüfen, wurden auf eine Säule, in der 2,5 mg ZON – AK in 0,5 g Glas immobilisiert waren, 5 ml einer ZON – Standardlösung mit einer Konzentration von 100 ng / ml in Wasser aufgetragen. Die Aufgabegeschwindigkeit wurde mittels einer Pumpe auf 0,5, 1, 1,5 bzw. 2 ml / min eingestellt. Die Säule wurde anschließend mit 5 ml Wasser gewaschen und ZON mit einer 50 % ACN – Lösung von der Säule eluiert. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

Die genaue Versuchsdurchführung ist im Kap. 5.2.6.2 nachzulesen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 78 dargestellt

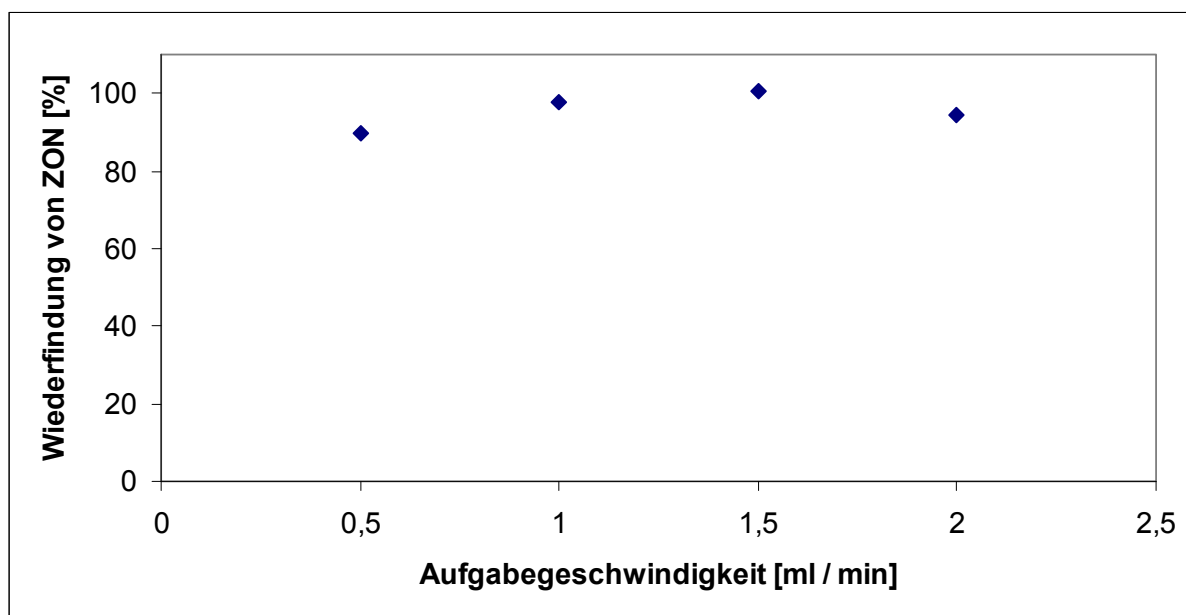


Abbildung 78: Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von ZON.

Die Abbildung 78 zeigt, dass die Aufgabe von Standardlösungen mit einer Geschwindigkeit bis zu 2 ml / min erfolgen kann, ohne dass ein Einfluss auf die Wiederfindung von ZON zu beobachten ist.

4.3.6.7 Batch zu Batch Reproduzierbarkeit

Um die Batch zu Batch Reproduzierbarkeit zu bestimmen, wurden fünf Säulen hergestellt, in denen 2,5 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren (Kap. 5.2.2). Bei diesen Säulen wurde die Wiederfindung von ZON zweimal untersucht. Dazu wurden 5 ml einer 100 ng / ml einer ZON – Standardlösung in H_2O_{bd} auf die Säulen aufgegeben, die Säulen wurden mit H_2O_{bd} gewaschen und ZON von der Säule mit einer 50 % ACN Lösung eluiert. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde bestimmt und die Wiederfindung von ZON berechnet (siehe Kap. 5.2.15.2). Aus den 10 Einzelwerten wurden der Mittelwert der Wiederfindung und die Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 24: Batch zu Batch Reproduzierbarkeit.

Säule Nr.	Versuch Nr.	Wiederfindung von ZON [%]
1	1	100
1	2	98
2	1	93
2	2	100
3	1	94
3	2	101
4	1	101
4	2	99
5	1	99
5	2	100
Mittelwert		98
Standardabweichung		3

Der Mittelwert der Wiederfindung betrug 98 %, die Standardabweichung 3 %.

Die Ergebnisse demonstrieren die hohe Batch zu Batch Reproduzierbarkeit der Sol – Gel – Säulen.

4.3.6.8 Intraday– und Interday Reproduzierbarkeit der Methode und Wiederverwendbarkeit der ZON – IAS

Um die Intraday – Reproduzierbarkeit (Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages) und die Interday – Reproduzierbarkeit (Reproduzierbarkeit an mehreren Tagen) zu überprüfen, wurde die Bestimmung der Wiederfindung wiederholt, indem 5 ml eines 50 ng / ml ZON Standards in Wasser auf eine Immunaффinitätssäule geladen wurden, in der 2,5 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und anschließend ZON mit einer 50 % ACN – Lösung eluiert. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt (siehe Kap.5.2.15.2). Die Säule wurde mit PBS regeneriert und dieser Versuch wiederholt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Intra– und Interday – Reproduzierbarkeit der Methode.

Tag	Versuchsnummer	Wiederfindung von ZON [%]	Mittelwert ± Standardabweichung
1	1	98	95 % ± 4 %
1	2	95	
1	3	96	
2	1	93	91 % ± 4 %
2	2	89	
2	3	85	
2	4	92	
3	1	89	93 % ± 4 %
4	1	96	
5	1	95	
6	1	93	
7	1	85	
8	1	85	
9	1	89	
10	1	92	

Aus den Einzelergebnissen ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindung von ZON der am Tag 1 durchgeführten Experimente:

$$95 \% \pm 4 \%$$

Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindung von ZON der am Tag 2 durchgeführten Experimente:

$$91 \% \pm 4 \%$$

Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindung von ZON aller Experimente:

$$93 \% \pm 4 \%$$

Nachdem alle Experimente mit einer ZON – IAS durchgeführt wurden, wurde gleichzeitig auch die Wiederverwendbarkeit der ZON – IAS gezeigt. Die Säule konnte im Standardversuch mindestens 10mal verwendet werden, ohne dass eine Abnahme der Wiederfindung von ZON beobachtet wurde.

4.3.7 Zusammenfassung der im Standardversuch optimierten Methode

Auf eine ZON – IAS wurde eine ZON – hältige Lösung aufgetragen. Die ACN oder MeOH Konzentration dieser Lösung sollte 10 % nicht übersteigen. Die Aufgabe der Lösung erfolgte mit einer Geschwindigkeit ≤ 2 ml / min. Danach wurde die Säule mit 5 ml 10 % MeOH gewaschen. ZON wurde von der Säule mit 4 ml 50 % ACN eluiert und das Eluat auf 5 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ aufgefüllt. Die Säulen wurden anschließend mit 20 ml PBS regeneriert und verschlossen bei 4 °C gelagert.

4.3.8 Anwendung der ZON – Immunaффinitätssäulen zur Aufarbeitung von Realproben

Die folgenden Untersuchungen wurden mit drei Realproben durchgeführt: einer Maisprobe, einem Weizenmehl und einem Weizenschrot. Vom Weizenschrot war bekannt, dass es sich um eine natürlich mit ZON kontaminierte Probe handelt. Diese

Probe und die Maisprobe stammten von Prof. Razzazi – Fazeli (Veterinärmedizinische Universität Wien), das Weizenmehl wurde in einem lokalen Supermarkt gekauft (siehe Kap. 5.3.1).

4.3.8.1 Extraktion von ZON aus Realproben

Die Extraktion von ZON wurde nach einer Methode durchgeführt, die der Hersteller der kommerziell erhältlichen Säulen (ZEARASTAR) empfiehlt. Die einzige Abweichung von dieser Vorschrift war, dass in der vorliegenden Arbeit ein Blaubandfilter anstelle eines Faltenfilters zur Filtration des Extrakts verwendet wurde, um ein Verstopfen der IAS zu vermeiden.

Es wurden 5 g Probe eingewogen und mit 20 ml 60 % ACN versetzt. Diese Suspension wurde eine Stunde unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Anschließend wurde die überstehende Lösung durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 30 ml verdünnt. Diese Lösung wurde auf die IAS aufgetragen.

4.3.8.2 Aufarbeitung einer Maisprobe

Mit der im Kap. 4.3.8.1 beschriebenen Methode wurde die mit 500 µg / kg gespikete Maisprobe extrahiert und aufgearbeitet (Kap. 4.3.7). In der Abbildung 79 ist das Chromatogramm der ZON – Spikelösung dargestellt. Die Abbildung 80 zeigt das Chromatogramm des aufgearbeiteten Extrakts der gespiketen Maisprobe.

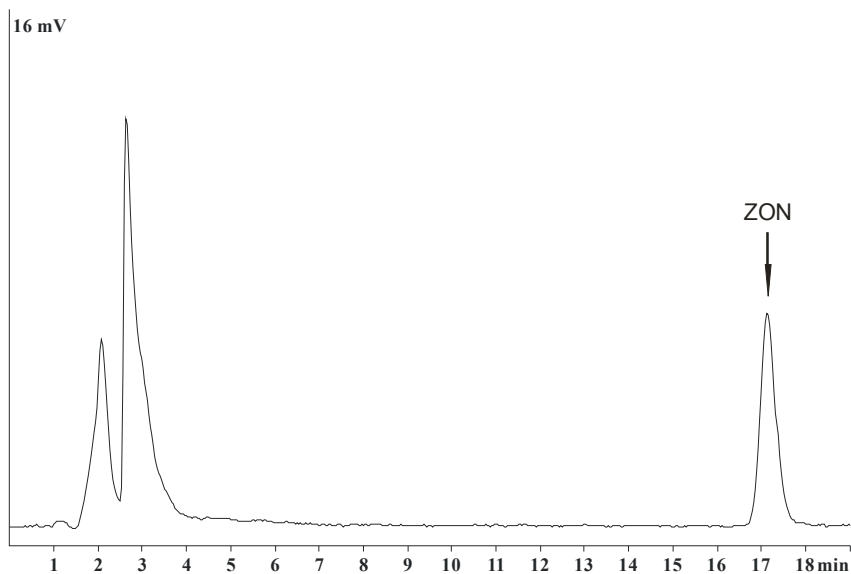


Abbildung 79: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung, Konzentration 50 ng / ml in Wasser, (HPLC – System 2–1).

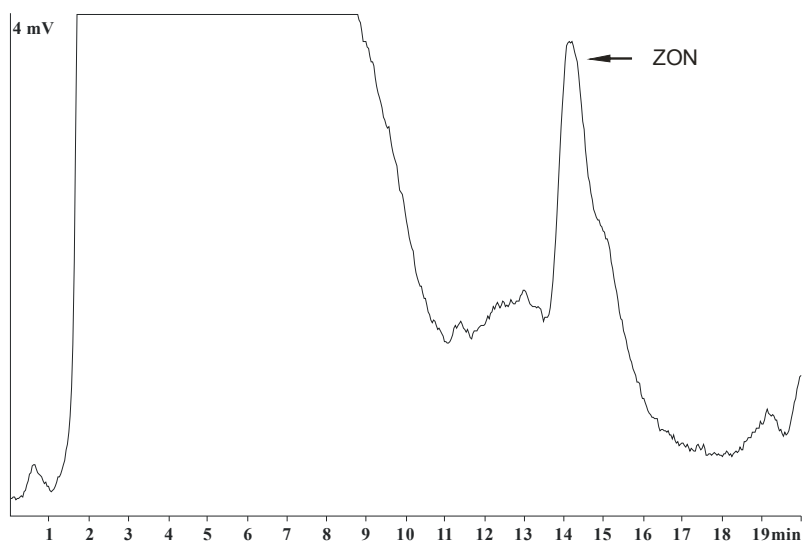


Abbildung 80: Chromatogramm des aufgearbeiteten Extrakts einer gespiketen Maisprobe (Spikelevel 500 µg / kg), aufgearbeitet mit einer ZON – Immunaффinitätssäule (HPLC – System 2–1).

Gegenüber der ZON – Retentionszeit der wässrigen Standardlösung passierte ZON aus dem Maiseluat um ca. 4 min früher das Detektorfenster.

Das Chromatogramm in der Abbildung 80 zeigt, dass die Matrix der Maisprobe schlecht abgetrennt werden konnte.

In einem weiteren Versuch wurde der Maismehlextrakt mittels Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigt (siehe Kap.5.3.2.4). Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 81 dargestellt.

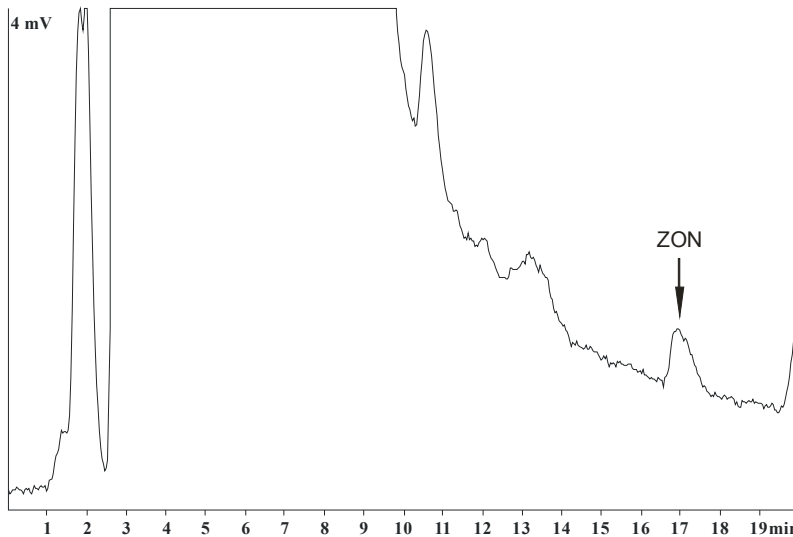


Abbildung 81: Chromatogramm des Eluats einer gespiketen Maisprobe, (Spikelevel 500 µg / kg), aufgearbeitet mit einer SPE Säule, (HPLC – System 2–1).

Man sieht, dass auch mit der SPE – Säule die Matrixbestandteile nicht effizient abgetrennt werden konnten.

Vom Hersteller der ZON – AK wurde uns mitgeteilt, dass die AK zuvor sowohl in einem ELISA als auch in Immunaффinitätssäulen verwendet worden waren und es in beiden Fällen zu Problemen aufgrund von Interferenzen durch Mais gekommen war. Nach dem Aufarbeiten einer Maisprobe mittels IAS wurde auch vom Hersteller eine Verschiebung der Retentionszeiten von ZON in der analytischen Säule beobachtet. Aufgrund dieser Informationen beschlossen wir, die Anwendbarkeit der ZON – IAS zur Aufarbeitung anderer Matrices zu untersuchen.

4.3.8.3 Aufarbeitung einer Weizenprobe

Wie schon im Kap. 4.3.8 erwähnt, standen uns zwei Weizenproben zur Verfügung. Mit dem Weizenmehl wurde eine Standardaddition für ZON durchgeführt, der Weizenschrot wurde verwendet, um zu prüfen, ob eine Extraktion mittels Accelerated

Solvent Extraction (ASE) zu höheren Wiederfindungsraten von ZON führt als die Extraktion mit 60 % ACN am Schüttler.

4.3.8.4 Vergleich der Accelerated Solvent Extraction mit der Extraktion mit 60 % ACN am Schüttler

Der Weizenschrot wurde sowohl mit 60 % ACN am Schüttler (siehe Kap. 5.3.2.3) als auch mittels ASE extrahiert (siehe Kap. 5.3.2.4). Die ASE Methode wurde von **[Pallaroni und Holst, 2003 (a)]** publiziert, und von der Firma Dionex empfohlen. Dabei wurde ZON mit einer ACN : MeOH, 50 : 50, (v : v) Lösung unter erhöhtem Druck und Temperatur aus der Probe extrahiert. Diese Methode ist automatisiert und wurde am Dionex ASE 100 Accelerated Solvent Extraktor durchgeführt. Nach der Extraktion wird die organische Lösung aus dem Probenextrakt am Rotavapor entfernt, der Rückstand in 1 ml MeOH aufgenommen und das Endvolumen auf 20 ml mit H_2O_{bd} aufgefüllt. Generell liegen die Vorteile der ASE Methode in ihrer Schnelligkeit, sie dauert in etwa 20 Minuten. Von Dionex wird eine Methode empfohlen, die aus zwei Extraktionszyklen besteht. Im Rahmen der Dissertation wurde auch getestet, ob bessere Ergebnisse mit drei Extraktionszyklen erzielt werden können. Außerdem wurde versucht, die AS – Extraktion mit einer ACN : H_2O_{bd} , 70 : 30, (v : v) Lösung anstatt der empfohlenen ACN : MeOH, 50 : 50, (v : v) Lösung durchzuführen.

Sämtliche Extrakte wurden auf die ZON – Immunaффinitätssäulen aufgegeben, die Säulen mit H_2O_{bd} gewaschen und anschließend die ZON – Konzentration im Eluat mittels des HPLC – Systems 2–2 bestimmt.

Die Abbildungen 82 und 83 zeigen die Chromatogramme der aufgearbeiteten Extrakte, Abbildung 82 mittels Extraktion am Schüttler, Abbildung 83 mittels AS – Extraktion mit zwei Extraktionszyklen und anschließender Aufarbeitung mittels einer ZON – Immunaффinitätssäule.

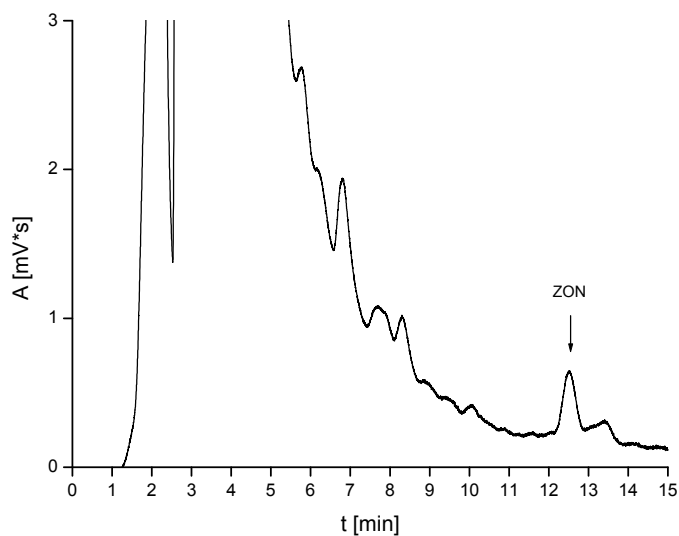


Abbildung 82: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, mit 60 % ACN am Schüttler extrahiert (HPLC – System 2–2).

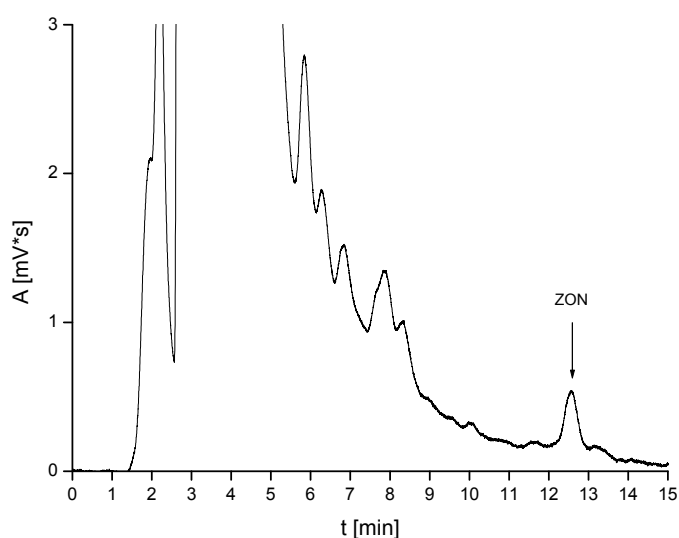


Abbildung 83: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, mittels ASE mit ACN : MeOH, 50 : 50 in zwei Extraktionszyklen extrahiert (HPLC – System 2–2).

Die erhaltenen Chromatogramme waren sehr ähnlich, sie wiesen viele Matrixpeaks auf und die Fläche der ZON – Peaks war annähernd gleich. Die Eluate unterschieden sich jedoch im Aussehen. Das nach der Extraktion am Schüttler

erhaltene Eluat war klar, das nach der AS – Extraktion mit zwei Extraktionszyklen war leicht milchig.

In der Abbildung 84 ist das Chromatogramm eines aufgereinigten Extrakts derselben Weizenschrotprobe, nach einer AS – Extraktion mit einer ACN : MeOH, 50 : 50, (v : v) Lösung in drei Extraktionszyklen und anschließender Aufarbeitung mit einer ZON – Immunaффinitätssäule dargestellt.

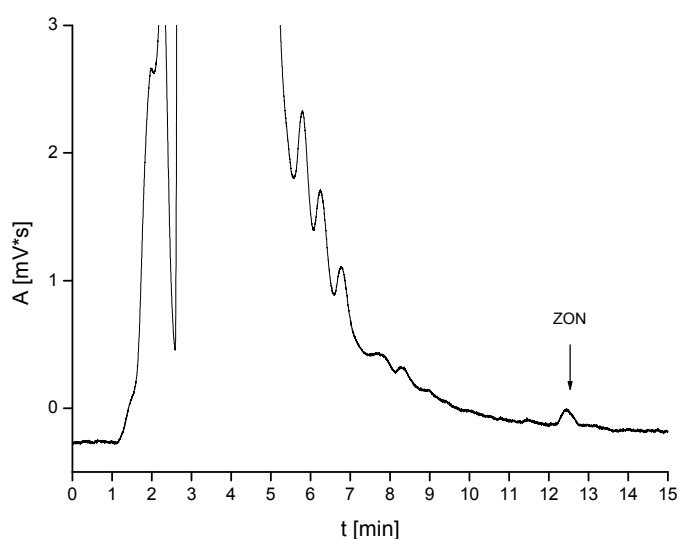


Abbildung 84: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, mittels ASE mit ACN : MeOH, 50 : 50 in drei Extraktionszyklen extrahiert (HPLC – System 2–2).

Der Vergleich der Chromatogramme, die in den Abbildungen 82 bis 84 dargestellt sind, zeigt, dass nach der dreifachen AS – Extraktion die ZON – Konzentration im Eluat der IAS deutlich niedriger ist als nach den anderen beiden Extraktionsmethoden. Das Eluat nach der AS – Extraktion mit drei Extraktionszyklen war milchig.

Zur AS – Extraktion mit einer ACN : H₂O_{bd}, 70 : 30, (v : v) Lösung konnte kein Chromatogramm aufgenommen werden, da nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor der Rückstand in 1 ml MeOH nicht in Lösung gegangen ist. Nach Zugabe von Wasser wurde eine milchige kolloide Lösung erhalten, die nicht filtriert werden könnte.

Die Ergebnisse der gefundenen ZON – Konzentrationen in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode sind in der Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Einfluss der Extraktionsmethode auf die gefundene ZON – Konzentration.

Extraktionsmethode	ZON – Konzentration [µg / kg Probe]
Schüttler	15
ASE – ACN : MeOH, 50 : 50, 2 Extraktionszyklen	11
ASE – ACN : MeOH, 50 : 50, 3 Extraktionszyklen	3
ASE – ACN : H ₂ O _{bd} , 70 : 30, 2 Extraktionszyklen	–

Aus der Tabelle 26 geht hervor, dass die ASE mit zwei Extraktionszyklen und die Extraktion mit 60 % ACN am Schüttler zu annähernd gleichen ZON – Konzentrationen im Eluat nach der Aufarbeitung der Extrakte mit einer ZON – Immunaффinitätssäule führen. Das Eluat nach der Extraktion am Schüttler war klar, das Eluat nach der ASE jedoch leicht milchig. Eine ASE mit drei Extraktionszyklen lieferte eine deutlich geringere ZON – Konzentration als die ersten zwei Methoden. Das Eluat nach der ASE mit 70 % ACN und zwei Extraktionszyklen wurde nicht in das HPLC – System injiziert, da es milchig und kolloid war. Versuche, das Eluat zu filtrieren, blieben erfolglos. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und Schwierigkeiten beim Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor, bei dem der Extrakt wiederholt explosionsartig verdampft ist, wurde diese Methode nicht mehr weiter verfolgt.

Die ASE wäre jedoch eindeutig die schnellere Extraktionsmethode gewesen, die Extraktion benötigte in etwa 20 Minuten. Bevor der Extrakt auf die Immunaффinitätssäule aufgegeben werden konnte, musste die organische Lösung am Rotavapor entfernt werden, der Rückstand wurde anschließend in 5 ml einer 10 % ACN Lösung aufgenommen, was eine zusätzliche Zeit in Anspruch genommen hat.

Die Extraktion am Schüttler dauert 1 Stunde. Auch hier musste vor dem Auftragen auf die Immunaффinitätssäule die ACN – Konzentration des Extrakts reduziert werden. Da es sowohl beim Entfernen des ACN am Rotavapor als auch beim Wegblasen mit Stickstoff zur Niederschlagsbildung kam und die ausgefallenen Partikel beim

Aufnehmen in ACN nicht mehr in Lösung gegangen sind, musste der Extrakt verdünnt werden, was in einem Aufgabevolumen von 30 ml resultierte. Im Endeffekt benötigten sowohl die AS – Extraktion als auch die Extraktion am Schüttler annähernd die gleiche Zeit, beim Auftragen auf die Immunaффinitätssäule hat der Extrakt nach der ASE wesentlich weniger Zeit in Anspruch genommen, denn es wurden nur 5 ml Lösung aufgetragen, im Gegensatz zu 30 ml, die nach der Extraktion am Schüttler auf die Säule aufgetragen wurden. Der Lösungsmittelverbrauch war bei beiden Methoden in etwa gleich hoch, bei der ASE ist jedoch der Anteil an organischem Lösungsmittel höher.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Untersuchungen auch weiterhin die Extraktion von ZON mit einer 60 % ACN – Lösung am Schüttler durchgeführt.

4.3.8.5 Standardaddition für die Weizenprobe

Mit der Weizenmehlprobe wurde eine Standardaddition durchgeführt. Da der Grenzwert für ZON in Mehl 75 µg / kg beträgt (siehe Kap. 1.4, Tabelle 2), wurden 4 Spikelevels von 0 bis 100 µg ZON / kg Probe angewendet. Es wurde mit einer ZON – Immunaффinitätssäule gearbeitet, in der 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems 2–2 bestimmt.

Die Abbildung 85 zeigt das Chromatogramm eines aufgearbeiteten Extrakts der ungespiketen Weizenmehlprobe, Abbildung 86 das Chromatogramm des aufgearbeiteten Extrakts der mit dem höchsten ZON – Spikelevel versetzten Weizenmehlprobe.

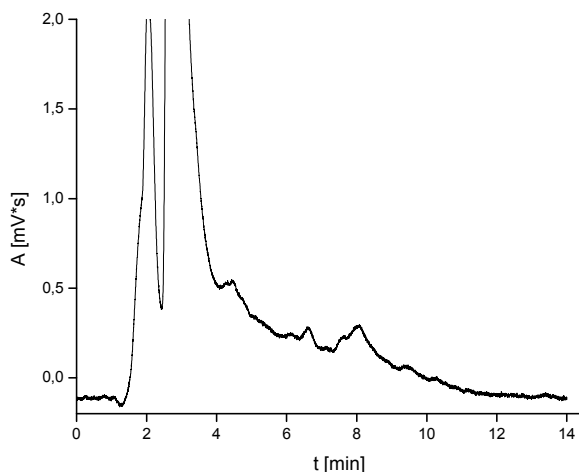


Abbildung 85: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe, ungespiket, (HPLC – System 2–2).

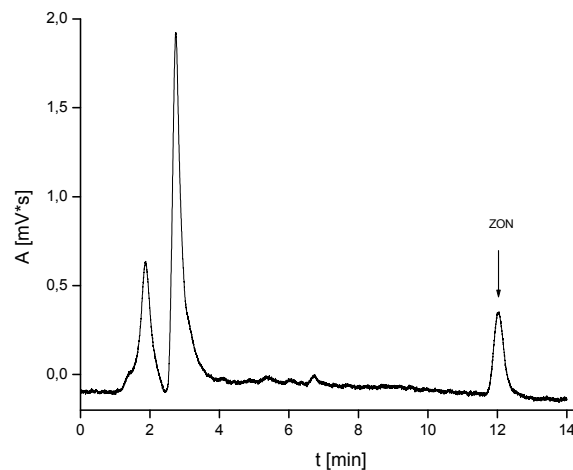


Abbildung 86: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel: 100 µg ZON / kg Probe), (HPLC – System 2–2).

Das Ergebnis der Standardaddition ist in Abbildung 87 dargestellt.

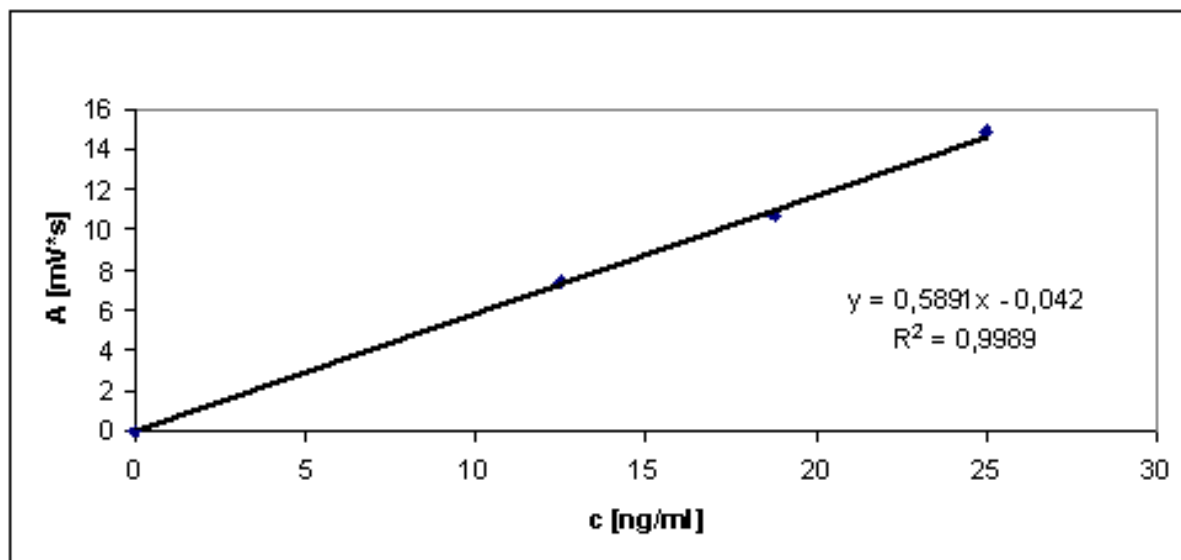


Abbildung 87: ZON – Standardaddition für eine Weizenprobe.

Aus der Division der Steigung der bei der Standardaddition erhaltenen Regressionsgerade durch die Steigung der Kalibriergerade ergab sich eine

Wiederfindung von 98 %, mit einer Standardabweichung von 3 %. Die Nachweisgrenze ($S / N = 3$) für ZON in Weizen betrug 4,1 $\mu\text{g} / \text{kg}$.

4.3.9 Identifizierung von ZON mittels LC / MS

Um die Identifikation von ZON zu verifizieren, wurden eine ZON – Standardlösung (500 ng / ml in H_2O) und der aufgearbeitete Extrakt der natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe in das LC / MS – System injiziert. Der Aufbau der LC / MS Apparatur und die angewendeten Bedingungen sind im Kap. 5.1.1 zusammengefasst. Unter diesen Bedingungen wurden „Extracted ion Chromatogramme“ (EIC) –, MS – und MS2 – Spektren aufgenommen.

Die Abbildungen 88 bis 91 zeigen die erhaltenen Chromatogramme und Spektren.

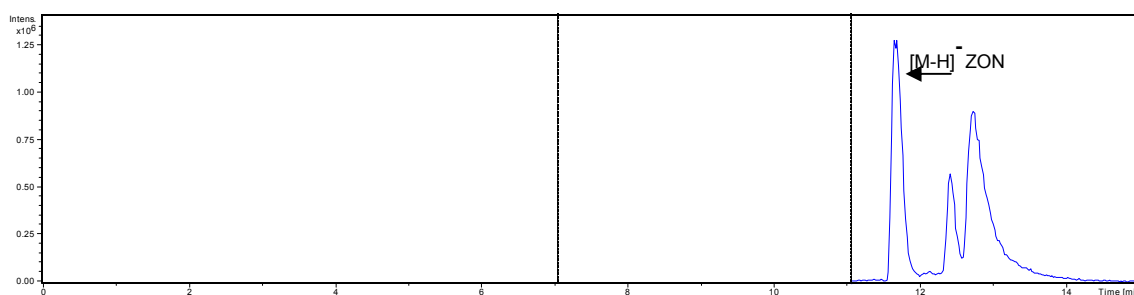


Abbildung 88: EIC ($m / z = 317$) einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H_2O . Die Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.

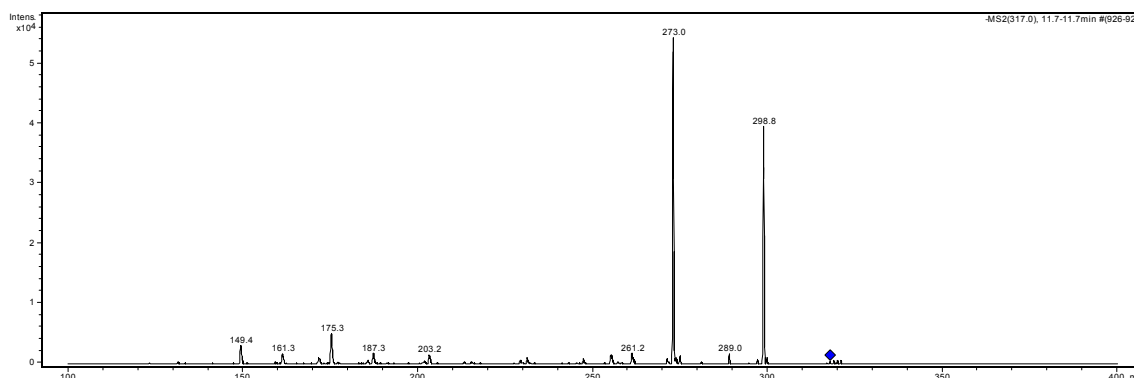


Abbildung 89: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H_2O .

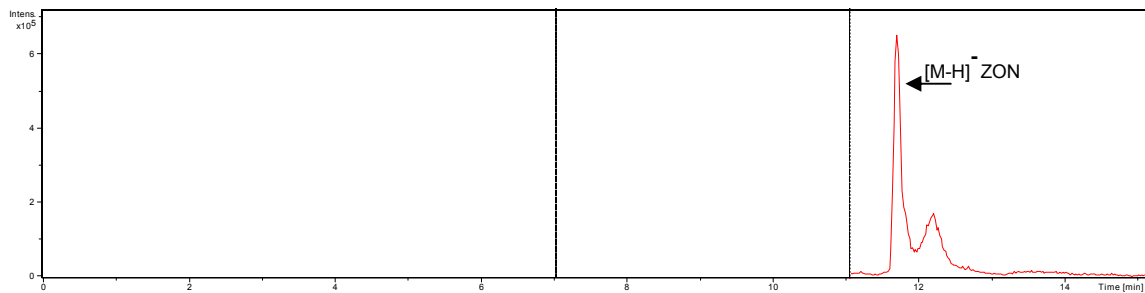


Abbildung 90: EIC ($m/z = 317$) eines mit einer ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe, die Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.

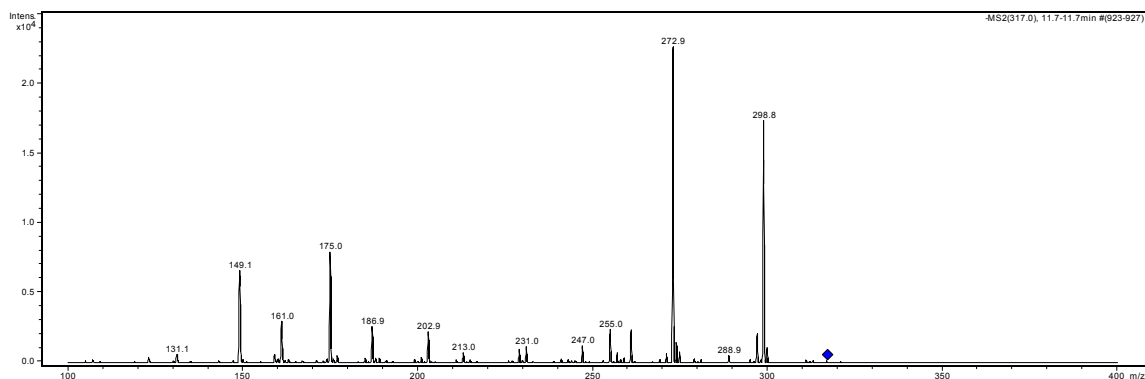


Abbildung 91: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion eines mit einer ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich ZON – kontaminierten Weizenschrotprobe.

Beim Vergleich der MS2 –Spektren des ZON – Peaks (Abbildung 89 und Abbildung 91) wurden sowohl für die ZON – Kalibrierlösung als auch für den aufgearbeiteten Extrakt einer natürlich ZON – kontaminierten Weizenschrotprobe das selbe Fragmentierungsmuster, mit den zwei intensivsten Fragmentationen mit einem m/z von 298,8 und 273,0 und weiteren 7 Fragmentationen, deren Intensität wesentlich geringer war, als die der Hauptfragmentationen, (m/z von 289,0; 261,2; 203,2; 187,3; 175,3; 161,3 und 149,4) beobachtet. Daraus geht hervor, dass es sich bei der mittels der HPLC – Systeme 2–1 und 2–2 detektierten Substanz tatsächlich um ZON handelt.

4.4 DON/ZON – Immunaффinitätssäulen

Als nächstes sollten Sol – Gel – Säulen, die sowohl DON – als auch ZON – AK enthielten, hergestellt und charakterisiert werden.

4.4.1 Unterschiede zwischen den DON und ZON Antikörpern

In den Voruntersuchungen mit den DON – und ZON – Antikörpern hat sich herausgestellt, dass die beiden Antikörper eine unterschiedliche Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen.

Die Extraktion von DON erfolgte mit Wasser, zur Extraktion von ZON war eine 60 % ACN – Lösung verwendet worden. Die Wechselwirkung zwischen ZON und den ZON – AK wird durch eine Anwesenheit von 10 % ACN nicht beeinflusst. Die Wechselwirkung zwischen DON und den DON – AK wird hingegen bereits durch eine geringe ACN – Konzentration beeinträchtigt.

Deshalb muss die ACN – Konzentration des auf die DON/ZON IAS aufgetragenen Extrakts soweit reduziert werden, dass die Bindung von DON an die DON – AK nicht gestört wird.

Aus diesem Unterschied könnte unter Umständen aber auch ein Vorteil werden, wenn es möglich wäre, die beiden Mykotoxine fraktioniert zu eluieren, d.h. zuerst bei einer niedrigeren ACN – Konzentration DON und danach bei einer höheren ACN – Konzentration ZON.

4.4.2 Bindungskapazität der DON/ZON – Immunaффinitätssäule

Es wurde eine Säule hergestellt, in der 0,5 mg DON – AK und 0,8 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren (siehe Kap. 5.2.2). Diese wurde mit einer DON – und ZON – hältigen Standardlösung (Konzentration jeweils 500 ng / ml) überladen. Die Säule wurde gewaschen und die beiden Analyte mit 4 ml 50 % ACN eluiert. Vor der Injektion in die HPLC Systeme 1–1 bzw. 2–2 wurde ACN aus dem Eluat im Stickstoffstrom entfernt und der Messkolben danach auf 5 ml aufgefüllt (siehe Kap. 5.2.10.3). Bei diesem Versuch ergab sich eine Bindungskapazität für DON von 1,3 µg DON / mg AK und für ZON von 8,6 µg ZON / mg AK.

4.4.3 Fraktionierte Elution

Als nächstes wurde untersucht, ob sich DON und ZON aufgrund der unterschiedlichen Affinität der DON und ZON – Antikörper durch eine fraktionierte Elution bereits im Elutionsschritt trennen lassen. Um dieses zu erreichen, müsste eine ACN – Konzentration gefunden werden, bei der die Bindung zwischen DON und den DON – AK aufgebrochen, die Wechselwirkung zwischen ZON und den ZON – AK jedoch nicht beeinträchtigt wird. Dazu wurden die Säulen, in denen 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren, mit jeweils 500 ng beider Analyte beladen, gewaschen und anschließend mit 1 ml Portionen des jeweiligen Elutionsmittels eluiert. Dazu wurden ACN – Wasser Lösungen von 10, 20, 30 bzw. 40 % verwendet (siehe Kap. 5.2.9.3). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 92 und 93 wiedergegeben. Die Abbildung 92 zeigt die Elutionskurven von DON in Abhängigkeit von der ACN Konzentration im Elutionsmittel, in der Abbildung 93 ist dieselbe Abhängigkeit für ZON dargestellt.

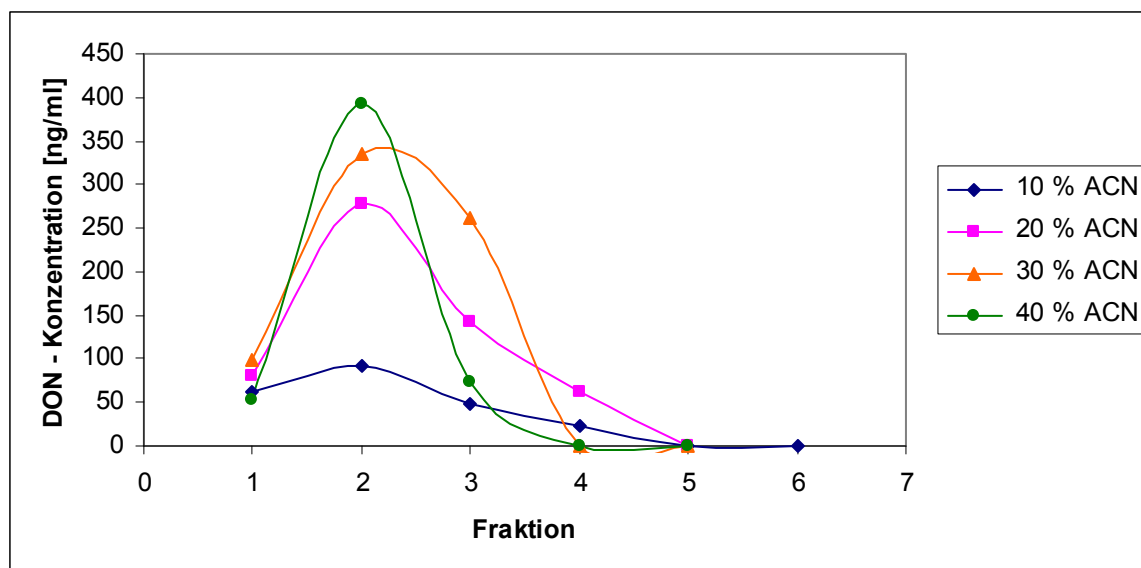


Abbildung 92: Einfluss der ACN – Konzentration im Elutionsmittel auf die DON – Konzentration in den Eluat – Fraktionen. Fraktionsvolumen: 1 ml.

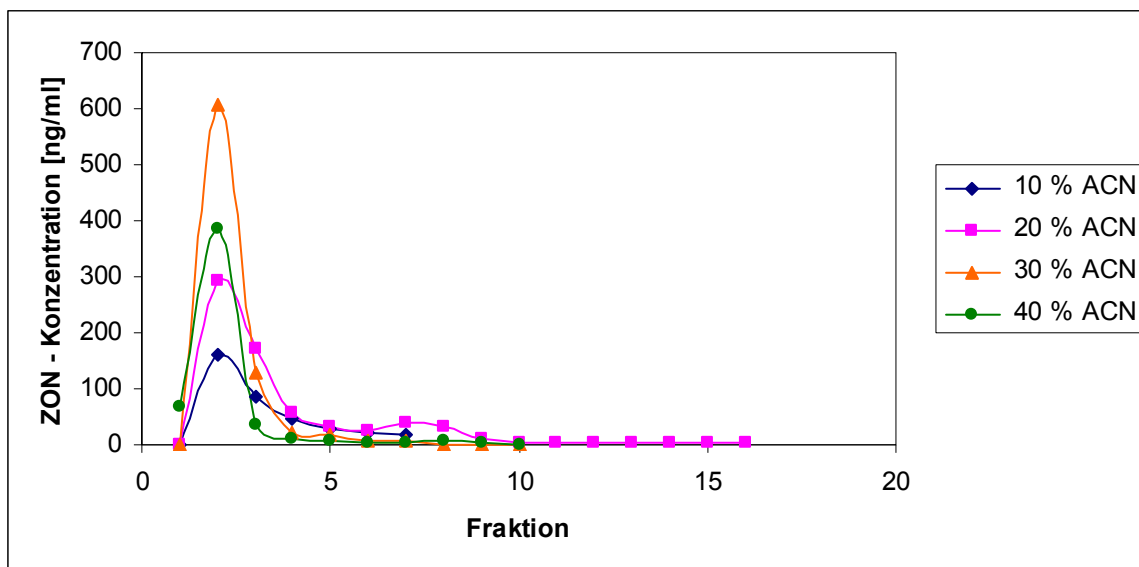


Abbildung 93: Einfluss der ACN – Konzentration im Elutionsmittel auf die ZON – Konzentration in den Eluat – Fraktionen. Fraktionsvolumen: 1 ml.

Aus dem Vergleich dieser beiden Abbildungen ist ersichtlich, dass die ACN – Konzentration zwar die in den einzelnen Fraktionen gefundene Analytmenge beeinflusst, es wurde jedoch keine ACN Konzentration gefunden, die für DON bereits eluierend wirkt, gleichzeitig für ZON jedoch ohne Elutionswirkung ist. DON und ZON lassen sich daher nicht von den DON/ZON – Immunaффinitätssäulen fraktioniert eluieren.

4.4.4 Reproduzierbarkeit der Methode

Als nächstes wurde sowohl die Intra – als auch die Interday Reproduzierbarkeit der Methode überprüft. Dazu wurde eine DON/ZON – Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren, mit einer Standardlösung beladen, die 100 ng / ml DON und 100 ng / ml ZON enthielt. Die Säule wurde mit H₂O_{bd} gewaschen und anschließend DON und ZON mit einer 50 % ACN – Lösung von der Säule eluiert. Die DON bzw. ZON Konzentration im Eluat wurde mittels der HPLC – Systeme 1–1 bzw. 2–2 bestimmt und die Wiederfindung berechnet.

Dieser Versuch wurde an zwei Tagen mehrmals wiederholt und aus den erhaltenen Ergebnissen die Intraday – Reproduzierbarkeit 1 und 2 berechnet. Aus den

Ergebnissen der Wiederholungen dieses Versuches an mehreren Tagen wurde die Interday – Reproduzierbarkeit berechnet. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 27: Intra– und Interday Reproduzierbarkeit einer DON/ZON – Immunaффinitätssäule.

Tag	Versuch Nr.	Wiederfindung von DON [%]	Wiederfindung von ZON [%]	Mittelwert ± Stabw. DON	Mittelwert ± Stabw. ZON
1	1	88	90	94 % ± 4 %	92 % ± 4 %
1	2	98	90		
1	3	96	89		
1	4	96	98		
2	1	97	92	95 % ± 1 %	91 % ± 2 %
2	2	92	89		
3	1	97	92	93 % ± 5 %	92 % ± 4 %
4	1	92	89		
5	1	88	90		
6	1	98	90		
7	1	96	89		
8	1	96	98		
9	1	83	95		

Aus den Einzelergebnissen ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindung der am Tag 1 durchgeführten Experimente:

DON: 94 % ± 4 %

ZON: 92 % ± 4 %

Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindung der am Tag 2 durchgeführten Experimente:

DON: 95 % ± 1 %

ZON: 91 % ± 2 %

Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindung aller durchgeführten Experimente:

DON: 93 % \pm 5 %

ZON: 92 % \pm 4 %

Man sieht, dass die Reproduzierbarkeit der Methode sehr hoch ist.

4.4.5 Versuche mit Realproben

Als nächstes wurde die Anwendbarkeit der DON/ZON Säule zur Aufarbeitung von Realproben untersucht

Da die ZON Säulen mit Mais schlechte Ergebnisse geliefert hatten, wurde als Matrix Weizen herangezogen. Für die Untersuchungen wurden Säulen verwendet, in denen 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren.

4.4.5.1 Vorversuche zur gleichzeitigen Extraktion von DON und ZON aus Realproben

Als erstes wurde eine Aufarbeitungsmethode gesucht, mit der DON und ZON gleichzeitig isoliert werden konnten. Die Vorversuche mit DON und ZON haben zu folgender Methode geführt: Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren, wurde aus dem Kühlschrank genommen, auf Raumtemperatur gebracht und mit 20 ml PBS gewaschen. Währenddessen wurden 25 g einer Weizenprobe eingewogen und mit 100 ml einer 60% ACN Lösung eine Stunde am Schüttler extrahiert. Der Extrakt wurde durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 35 ml verdünnt und das verdünnte Filtrat mit einer Fließgeschwindigkeit ≤ 2 ml / min auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 5 ml 10 % MeOH gewaschen. Die Analyte wurden von der Säule mit 4 ml 50 % ACN eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Kolben mit H₂O_{bd} auf 5 ml aufgefüllt. Die Säule wurde mit 20 ml PBS regeneriert und verschlossen im Kühlschrank gelagert.

4.4.5.2 Aufarbeiten einer Realprobe

Die in Kap. 4.4.5.1 beschriebene Methode wurde auf die Weizenmehlprobe angewendet, die bereits für die Standardaddition von DON und für die Standardaddition von ZON verwendet wurde. In dieser Probe wurde weder DON noch ZON gefunden. Es wurden 4 Ansätze gemacht: einmal wurde die Probe ungespiket extrahiert und aufgearbeitet, die anderen 3 Ansätze wurden mit unterschiedlichen DON und ZON Mengen gespiket. Die verdünnten Extraktionslösungen wurden auf 4 Immunaффinitätssäulen aufgetragen, in denen 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Die Säulen wurden gewaschen und DON bzw. ZON mit 50 % ACN von der Säule eluiert. Nach der Injektion der Eluat aliquote in die HPLC – Systeme 1–1 und 2–2 wurden die Chromatogramme ausgewertet, die Peakflächen gegen die Spikelevels aufgetragen und mittels Excel eine Regressionsgerade der Standardadditionsmethode berechnet (siehe Kap. 5.3.11.3). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 94 und 95 dargestellt.

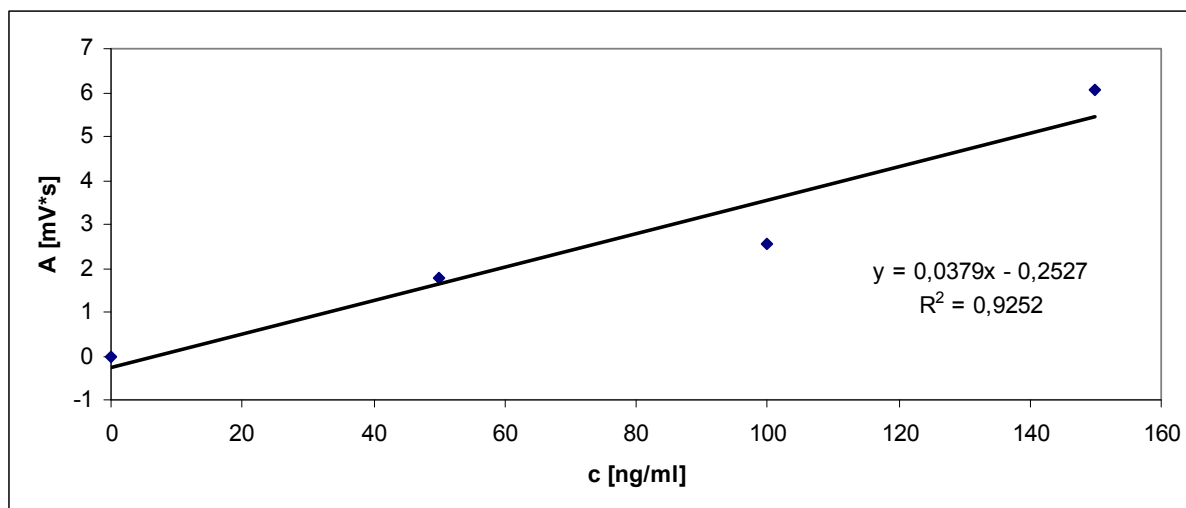


Abbildung 94: Regressionsgerade der Standardadditionsmethode für DON.

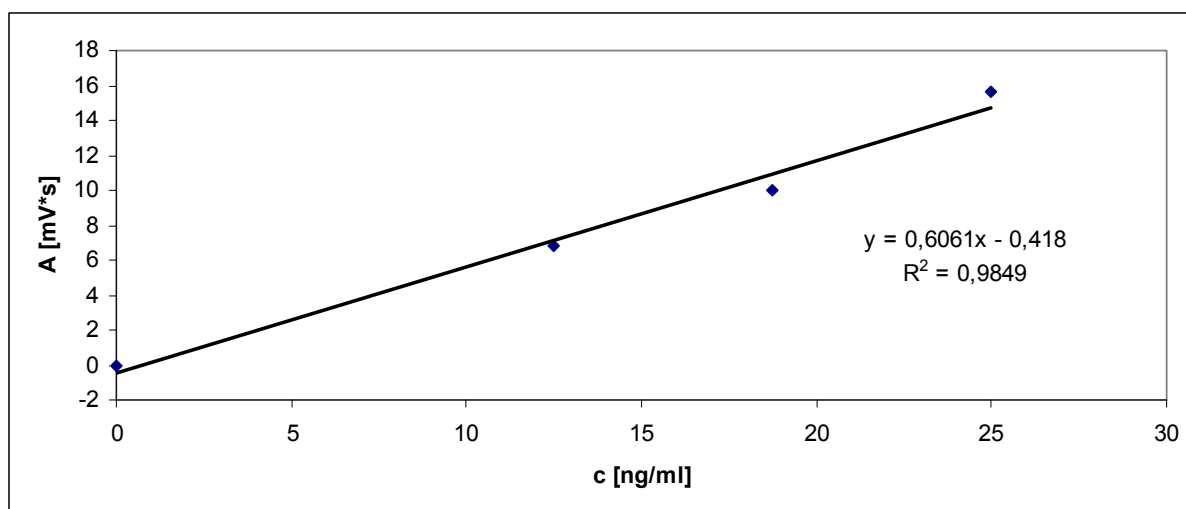


Abbildung 95: Regressionsgerade der Standardadditionsmethode für ZON.

Anschließend wurden die Wiederfindungen für beide Analyte berechnet. Für ZON wurde eine Wiederfindung von 95 % erzielt, für DON betrug die Wiederfindung jedoch nur 61 %.

4.4.5.3 Versuche zur Verbesserung der Wiederfindung von DON

Um die Wiederfindung von DON zu verbessern, wurden folgende Ansätze gemacht: Als erstes sollte der Einfluss der ACN – Konzentration der auf die IAS – Säule aufgetragenen Lösung überprüft werden, danach sollte MeOH als Extraktionsmittel getestet werden.

4.4.5.3.1 Einfluss der ACN – Konzentration in der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von DON und ZON

Die nicht kontaminierte Weizenmehlprobe wurde mit 600 µg DON bzw. 100 µg ZON pro kg Probe gespiket und extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert und jeweils ein 5 ml Aliquot des Filtrats mit PBS so weit verdünnt, dass die ACN – Konzentration 5 % bzw. 2,5 % betrug.

Zum Aufarbeiten der verdünnten Filtrate wurden vier DON/ZON – Immunaффinitätssäulen verwendet, in denen jeweils 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Diese Säulen waren schon in den vorigen Versuchen verwendet worden.

Auf die ersten zwei Säulen wurde das auf 5 % ACN verdünnte Filtrat aufgetragen, auf die anderen zwei Säulen das auf 2,5 % ACN verdünnte Filtrat.

Das bedeutet, dass bei einer ACN – Konzentration in der Aufgabelösung von 5 % 5 ml des ursprünglichen Filtrates auf 60 ml mit PBS verdünnt wurden, bei einer ACN – Konzentration in der Aufgabelösung von 2,5 % wurden 5 ml des Filtrats auf 120 ml mit PBS verdünnt, siehe Kap. 5.3.4.

Die Wiederfindungen der Einzelversuche sind in der untenstehenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 28: Einfluss der ACN – Konzentration in der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von DON und ZON.

ACN – Konzentration [%]	Wiederfindung von DON [%]	Wiederfindung von ZON [%]
5	38	96
5	40	95
2,5	84	99
2,5	93	101

Aus der Tabelle 28 geht hervor, dass eine geringere Konzentration an ACN in der aufgetragenen Lösung eine höhere Wiederfindung an DON ermöglicht. Weiters haben wir festgestellt, dass auch relativ große Auftragsvolumina von 60 bzw. 120 ml die Wiederfindung nicht beeinträchtigen.

4.4.5.3.2 Einfluss der Extraktion mit MeOH auf die Wiederfindung von DON und ZON

Als nächstes wurde geprüft, wie hoch die Wiederfindung ist, wenn die Extraktion von DON und ZON mit 60 % MeOH anstatt mit 60 % ACN durchgeführt wird. Dazu wurde die mit ZON – kontaminierte Weizenschrotprobe herangezogen. Die Probe wurde vor der Extraktion mit DON gespiket (Spikelevel 400 µg DON / kg Probe). Danach wurde einmal mit 60 % ACN und einmal mit 60 % MeOH extrahiert. Beide Extrakte wurden filtriert und mit PBS so verdünnt, dass die Konzentration des organischen Lösungsmittels dadurch auf 10 % herabgesetzt wurde, d.h. 5 ml des Extrakts wurden

auf 30 ml verdünnt (siehe Kap. 5.2.7). Das verdünnte Filtrat wurde wiederum auf jeweils zwei DON/ZON Säulen aufgetragen.

Parallel dazu wurden die verdünnten Filtrate auch auf jeweils zwei kommerziell erhältliche Immunaффinitätssäulen (DONPREP – Säulen zur Isolierung von DON, ZEARASTAR – Säulen zur Isolierung von ZON) aufgetragen (siehe Kap. 5.3.12 bzw. 5.3.14). Da keine neuen DONPREP – Säulchen zur Verfügung standen, wurden welche verwendet, die schon seit einem Jahr abgelaufen waren. Die ZEARASTAR – Säulchen wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Bei den DONPREP – Säulchen musste das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll modifiziert werden. Der Hersteller geht davon aus, dass die Extraktion von DON mit H₂O erfolgt. Da zur Co – Extraktion von DON und ZON in der vorliegenden Arbeit 60 % ACN bzw. 60 % MeOH verwendet wurde, musste die ACN – Konzentration herabgesetzt werden. Dazu wurden 2 ml des Filtrats mit PBS verdünnt, die ACN – bzw. MeOH – Konzentration im verdünnten Filtrat betrug 4 %. Diese Lösung wurde auf die DONPREP – Säulen aufgegeben

Die Abbildungen 96 bis 99 zeigen die erhaltenen Chromatogramme.

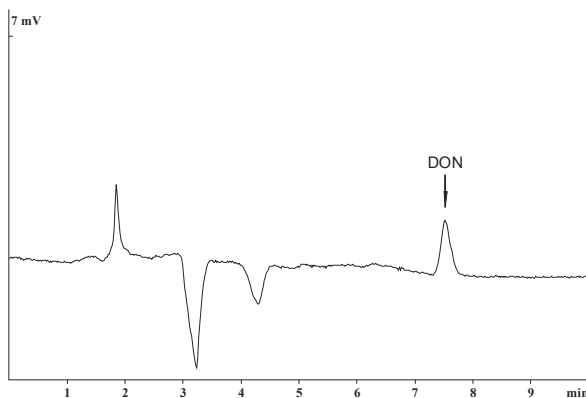


Abbildung 96: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).

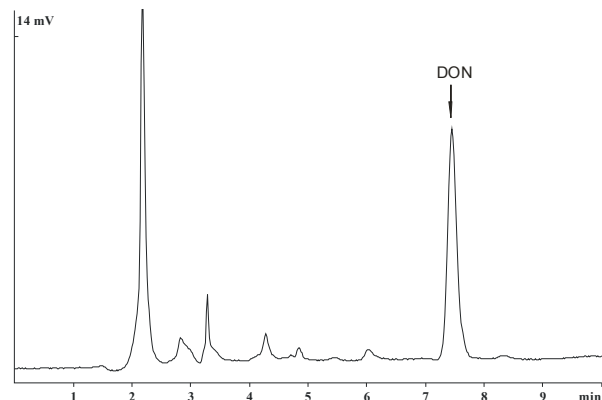


Abbildung 97: Chromatogramm eines mit der DONPREP – Säule aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).

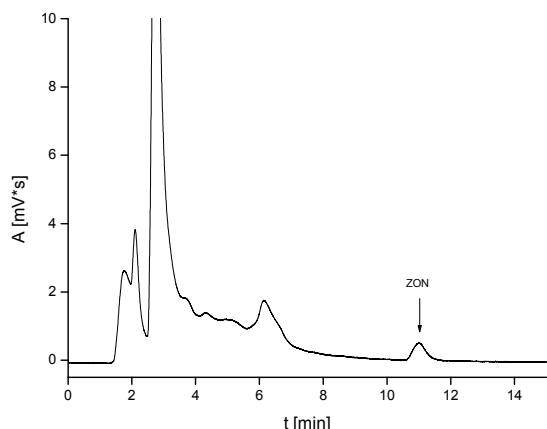


Abbildung 98: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).

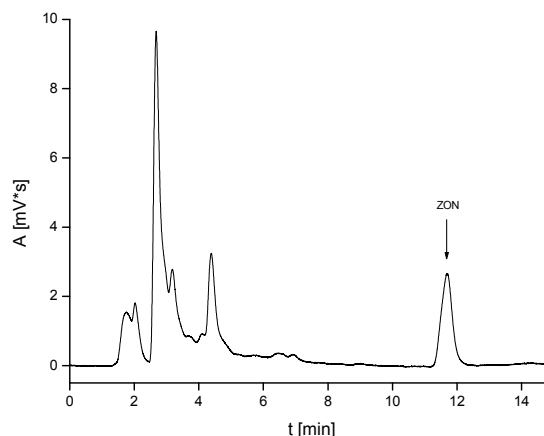


Abbildung 99: Chromatogramm eines mit der ZEARASTAR – Säule aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).

Aus den Abbildungen 96 bis 99 geht hervor, dass sich die DON/ZON IAS als so selektiv erwies wie die kommerziell erhältlichen DON und ZON Säulen.

In der Tabelle 29 sind die gefundenen DON – und ZON – Konzentrationen in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel zusammengefasst und als Referenz die Ergebnisse, die mit kommerziell erhältlichen Säulen erhalten wurden.

Tabelle 29: Einfluss der Extraktionslösung auf die gefundene Konzentration von DON und ZON.

Säule	Extraktions- lösung	Gefundene Konzentration von DON [µg / kg]	Gefundene Konzentration von ZON [µg / kg]
DON/ZON – IAS	60 % ACN	903	91
DON/ZON – IAS	60 % ACN	1219	101
DON/ZON – IAS	60 % MeOH	870	97
DON/ZON – IAS	60 % MeOH	1137	91
DONPREP	60 % ACN	3392	–
DONPREP	60 % MeOH	3203	–
ZEARASTAR	60 % ACN	–	95
ZEARASTAR	60 % MeOH	–	85

Bei der Aufarbeitung mit der DONPREP – Säule wurde eine signifikant höhere DON – Konzentration erhalten als bei der Aufarbeitung mit den DON/ZON – IAS. Das lässt darauf schließen, dass die Kapazität der DON/ZON – Säulen überschritten worden war.

Bei der Isolierung von ZON wurde mit den DON/ZON – Immunaффinitätssäulen ein ähnliches Ergebnis erzielt wie mit den ZEARASTAR – Säulchen.

In allen folgenden Versuchen wurde zur Co – Extraktion von DON und ZON 60 % ACN eingesetzt.

4.4.5.3.3 Einfluss der aufgegebenen DON – Menge im Filtrat

Als nächstes wurde die DON und ZON hältige Weizenprobe wiederholt extrahiert, 1 ml Aliquote dieser Extrakte wurde mit PBS auf 50 ml verdünnt und auf 4 DON/ZON – Immunaффinitätssäulen aufgetragen. Nach der Elution wurde die Lösung im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, der Rückstand mit 0,3 ml ACN in einen 1 ml – Messkolben transferiert und der Kolben mit H₂O_{bd} aufgefüllt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Gefundene DON – und ZON – Konzentrationen bei reduzierter Aufgabemenge des Extrakts.

Säule	Gefundene Konzentration von DON [µg / kg]	Gefundene Konzentration von ZON [µg / kg]
DON/ZON – IAS	3371	103
DON/ZON – IAS	4723	122
DON/ZON – IAS	4318	115
DON/ZON – IAS	4578	109

Die Tabelle 30 zeigt, dass durch eine gleichzeitige Reduktion des Extraktvolumens und der ACN – Konzentration in der Aufgabelösung auf 1,2 % eine Verbesserung der Wiederfindung für DON erzielt wurde, ohne die ZON – Wiederfindung zu verschlechtern.

Die gefundene DON – Konzentration war höher als die, die bei derselben gespiketen Probe nach Aufarbeitung mittels DONPREP ermittelt worden ist. Offensichtlich war die Leistung der DONPREP – Säulchen durch das überschrittene Ablaufdatum beeinträchtigt.

Die Abbildung 100 zeigt das Chromatogramm der Weizenschrotprobe nach Aufarbeitung mit einer DON/ZON – Immunaффinitätssäule.

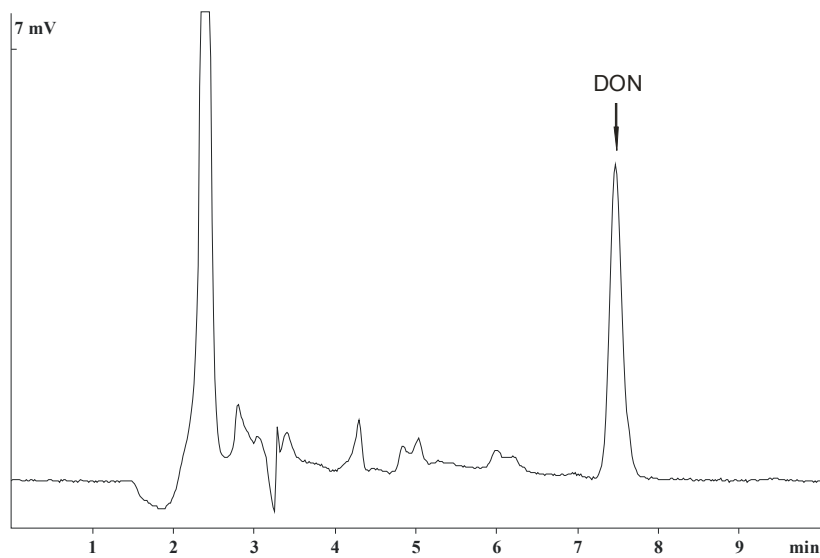


Abbildung 100: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, natürlich kontaminiert, ungespiket (HPLC – System 1–1).

4.4.5.4 Standardaddition mit einer nicht kontaminierten Weizenmehlprobe

Als nächstes sollte die Wiederfindung von DON und ZON durch Spiken der DON/ZON – nichtkontaminierten Weizenmehlprobe überprüft werden. Es wurden 2 Spikelevels gewählt, und zwar 200 bzw. 600 µg DON / kg Probe und 50 bzw. 100 µg ZON / kg Probe. Zur Probenaufarbeitung wurden Immunaффinitätssäulen verwendet, in denen jeweils 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Zuerst wurden die DON/ZON – Säulen mit jeweils 5 ml des Filtrats beladen, welches mit PBS auf 120 ml verdünnt wurde, um eine ACN Konzentration in dieser Lösung von 2,5 % zu erreichen.

Die Aufgabe großer Probenvolumina erfolgte mit Probenbehältern, die über Teflonkonnektoren mit den DON/ZON – Immunaффinitätssäulen verbunden waren. Die Behälter hatten ein Fassungsvermögen von 50 ml. Die Abbildung 101 zeigt die Apparatur.



Abbildung 101: Aufgabe von großen Volumina auf die DON/ZON – IAS.

Bei einem Probenvolumen größer 50 ml wurde die Probe aus einem Vorratsgefäß portioniert aufgetragen, nach der letzten Portion wurde das Vorratsgefäß mit wenig PBS ausgespült und die Spüllösung ebenfalls aufgetragen.

Die Abbildungen 102 bis 105 zeigen die Chromatogramme der aufgearbeiteten Extrakte für beide Spikelevel.

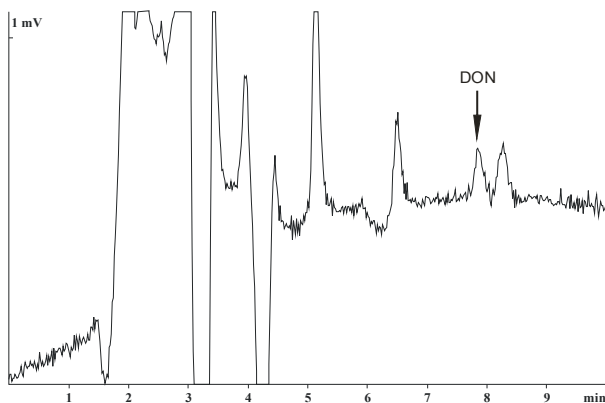


Abbildung 102: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 200 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).

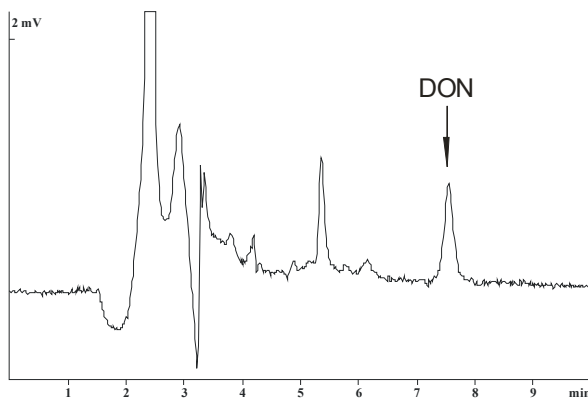


Abbildung 103: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 600 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).

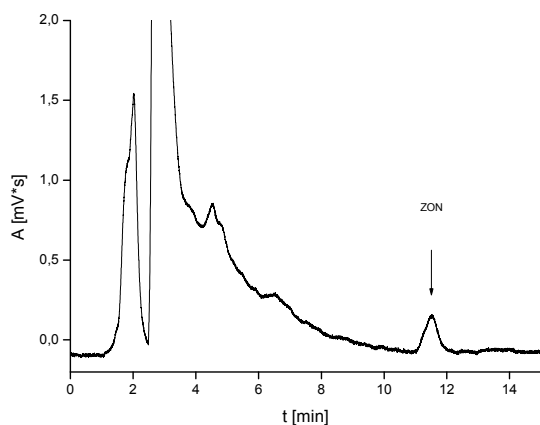


Abbildung 104: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 50 µg ZON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).

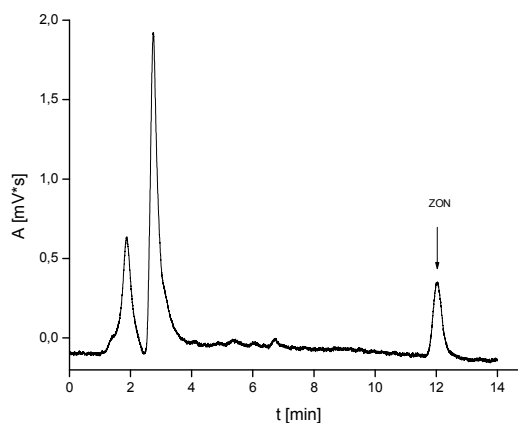


Abbildung 105: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 100 µg ZON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).

Die Tabelle 31 fasst die Ergebnisse des Spikeversuchs zusammen.

Tabelle 31: Ergebnisse der Standardaddition von DON und ZON für eine Weizenprobe.

DON			ZON		
Spikelevel [µg / kg]	Gefundene Konzentration [µg / kg]	Wieder- findung [%]	Spikelevel [µg / kg]	Gefundene Konzentration [µg / kg]	Wieder- findung [%]
200	181	90	50	46	92
200	186	93	50	48	96
200	180	90	50	49	99
200	178	89	50	48	97
600	267	44	100	96	96
600	332	55	100	104	104
600	320	53	100	96	96
600	318	53	100	101	101
Mittelwert ± Stabw. Spikelevel 200 [µg / kg]		91 % ± 2 %	Mittelwert ± Stabw. Spikelevel 50 [µg / kg]		93 % ± 3 %
Mittelwert ± Stabw. Spikelevel 600 [µg / kg]		52 % ± 5 %	Mittelwert ± Stabw. Spikelevel 100 [µg / kg]		100 % ± 4 %

Aus den Einzelergebnissen ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

Mittelwert der Wiederfindung von DON beim Spikelevel 200 µg / kg: 91 % ± 2 %

Mittelwert der Wiederfindung von DON beim Spikelevel 600 µg / kg: 52 % ± 5 %

Mittelwert der Wiederfindung von ZON beim Spikelevel 50 µg / kg: 93 % ± 3 %

Mittelwert der Wiederfindung von ZON beim Spikelevel 100 µg / kg: 100 % ± 4 %

Bei ZON wurden für beide Spikelevel gute Ergebnisse erhalten. Bei DON wurde nur für das niedrigere Spikenniveau ein zufrieden stellendes Ergebnis erhalten – der Mittelwert der Wiederfindung betrug 91 % mit einer Standardabweichung von 2 %.

Beim höheren Spikenniveau wurde nur eine Wiederfindung von 52 % mit einer Standardabweichung von 5 % erhalten.

Die Vermutung lag nahe, dass beim Aufarbeiten der höher gespiketen Probe die Bindungskapazität der Säule für DON überschritten worden war.

Um das zu überprüfen, wurde der vorherige Versuch modifiziert. Die Weizenmehlprobe wurde mit 600 µg DON / kg Probe und 100 µg ZON / kg Probe gespiket und extrahiert. Dieses Mal wurde nur 1 ml des Filtrats mit PBS auf 50 ml verdünnt und diese Lösung auf die Immunaффinitätssäulen aufgetragen, in denen 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Die Säulen wurden mit H₂O_{bd} gewaschen und DON und ZON anschließend mit 50 % ACN eluiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, der Rückstand mit 0,3 ml ACN in einen 1 ml – Messkolben transferiert und der Kolben mit H₂O_{bd} aufgefüllt

Die Abbildungen 106 und 107 zeigen zwei der erhaltenen Chromatogramme.

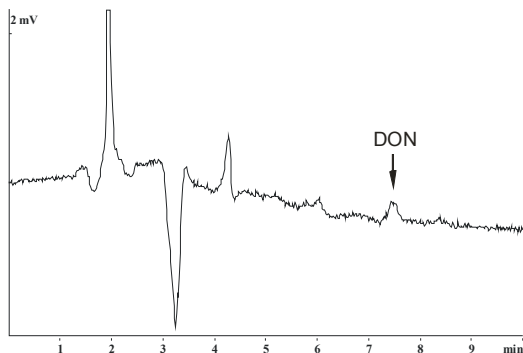


Abbildung 106: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 200 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).

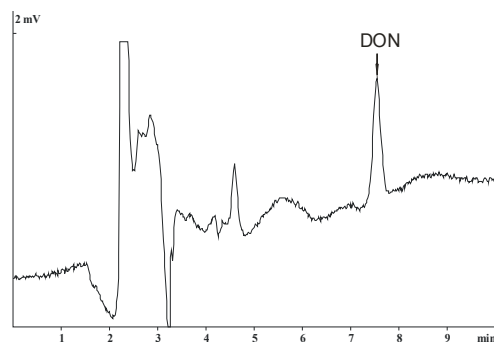


Abbildung 107: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 600 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).

In der Tabelle 32 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 32: Ergebnisse der Standardaddition mit einer DON und ZON – freien Weizenprobe.

DON			ZON		
Spikelevel [µg / kg]	Gefundene Konzentration [µg / kg]	Wiederfindung [%]	Spikelevel [µg / kg]	Gefundene Konzentration [µg / kg]	Wiederfindung [%]
600	547	91	100	100	100
600	566	94	100	98	98
600	604	101	100	98	98
600	594	99	100	100	100
Mittelwert		96	Mittelwert		99
Standardabweichung		4	Standardabweichung		1

Unter Berücksichtigung der durch die Matrixanwesenheit geminderten DON – Bindungskapazität der DON/ZON – Immunaффinitätssäule ist es gelungen, die Prozedur so zu optimieren, dass sie auch zur Aufarbeitung von Extrakten von höher belasteten Weizenproben angewendet werden kann. Dabei wurden hohe Wiederfindungsraten sowohl für DON (96 %) als auch für ZON (99 %) erzielt. Die Nachweisgrenze ($S / N = 3$) betrug 108 µg / kg für DON und 4,1 µg / kg für ZON.

4.4.6 Wiederverwendbarkeit der DON/ZON – Immunaффinitätssäulen

Es wurden vier DON/ZON – Immunaффinitätssäulen, in denen 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren, auf ihre Wiederverwendbarkeit getestet. Nachdem diese Säulen für die Aufarbeitung von 4 Standardlösungen und 11 Weizenprobenextrakten verwendet worden waren, wurden die Wiederfindungsraten für DON und ZON bestimmt. Dazu wurden die Säulen mit 5 ml einer Standardlösung beladen, die 100 ng / ml DON und 100 ng / ml ZON enthielt. Die Säulen wurden mit H_2O_{bd} gewaschen und anschließend DON und ZON mit einer 50 % ACN – Lösung von der Säule eluiert. Die DON bzw. ZON

Konzentration im Eluat wurde mittels der HPLC – Systeme 1–1 bzw. 2–2 bestimmt und die Wiederfindung für DON und ZON berechnet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Wiederverwendbarkeit der DON/ZON – Immunaффinitätssäulen.

Säule	Wiederfindung von DON [%]	Wiederfindung von ZON [%]
1	95	92
2	95	94
3	98	95
4	100	95
Mittelwert	97	94
Standardabweichung	2	2

Nach der Aufarbeitung von 4 Standardlösungen und 11 Weizenprobenextrakten betrug die Wiederfindung für DON 97 % \pm 2 %, für ZON 94 % \pm 2 %.

Sowohl diese Ergebnisse als auch die Ergebnisse aus dem Kap. 4.4.4 haben gezeigt, dass die Elution mit 50 % ACN nicht zu einer irreversiblen Denaturierung der DON – und ZON Antikörper führt.

4.4.7 Qualitative und quantitative Bestimmung von DON und ZON mittels LC / MS

Zum Abschluss dieser Arbeit wurde die mit DON und ZON kontaminierte Weizenprobe mittels einer Immunaффinitätssäule aufgearbeitet, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas immobilisiert waren. Das Eluat wurde in das LC / MS – System injiziert. Die erhaltenen Extracted Ion Chromatogramme (EIC) und MS2–Spektren wurden mit Chromatogrammen und Spektren einer DON und ZON – hältigen Standardlösung verglichen. Die Abbildungen 108 bis 111 zeigen die erhaltenen Chromatogramme und Spektren.

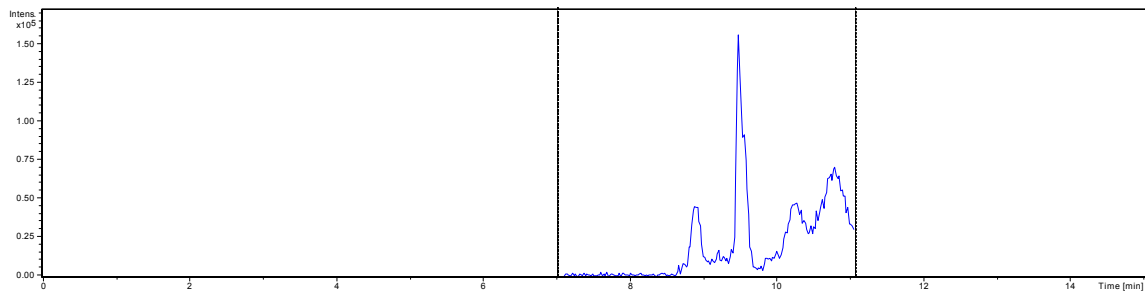


Abbildung 108: EIC ($m/z = 295$) eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe, Retentionszeit von DON betrug 9,5 min.

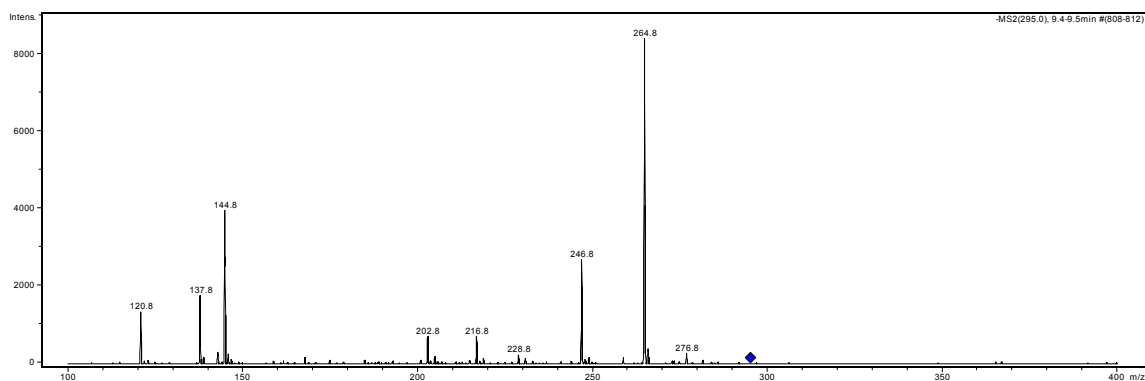


Abbildung 109: MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,4 – 9,5 min) nach Injektion eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe.

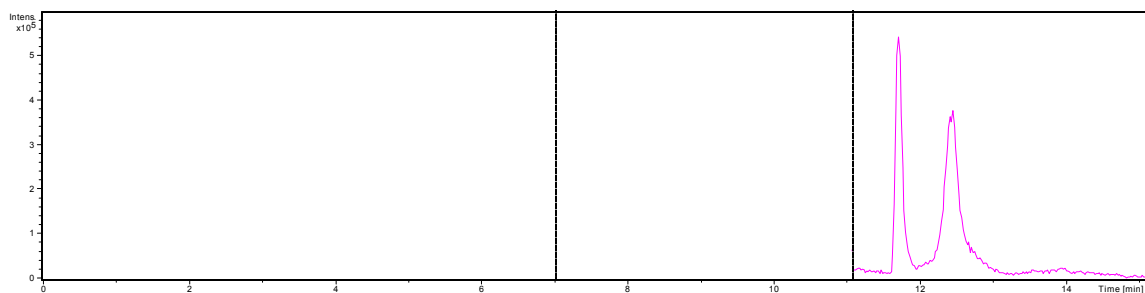


Abbildung 110: EIC ($m/z = 317$) eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe, Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.

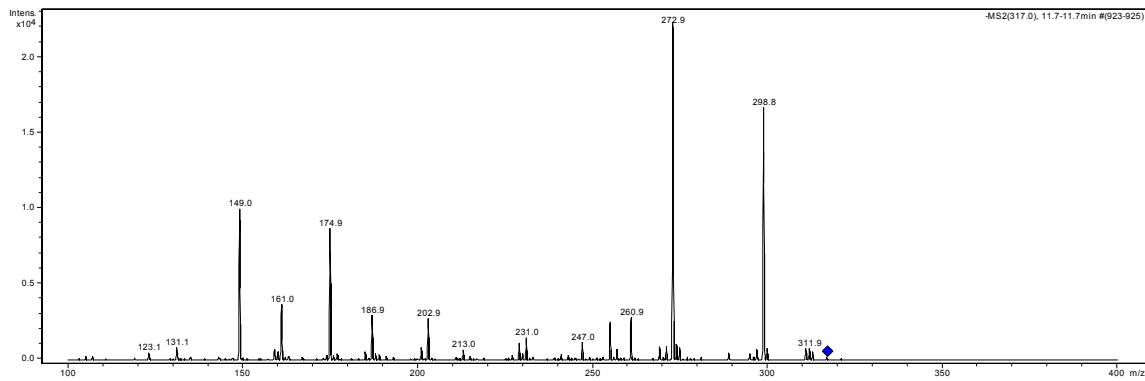


Abbildung 111: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe.

Die folgenden Abbildungen zeigen Chromatogramme und Spektren von DON und ZON Standardlösungen.

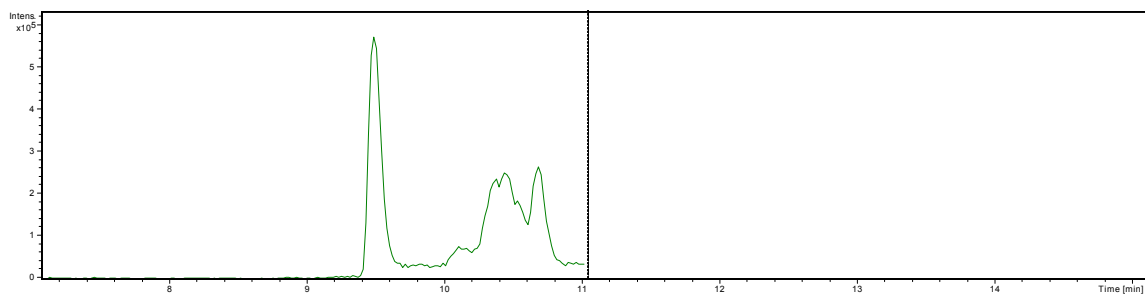


Abbildung 112: EIC (m / z = 295) einer DON – Standardlösung, 1000 ng / ml in H₂O. Die Retentionszeit von DON betrug 9,5 min.

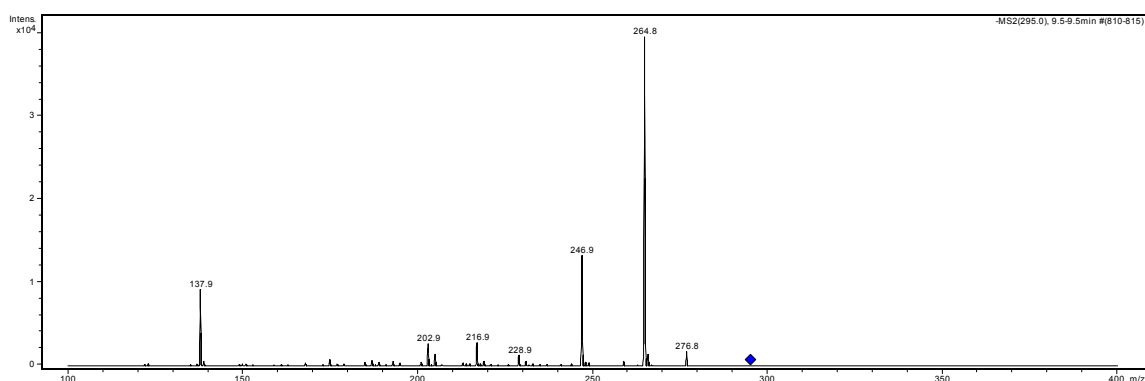


Abbildung 113: MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,5 min) nach Injektion einer DON – Standardlösung, 1000 ng / ml in H₂O.

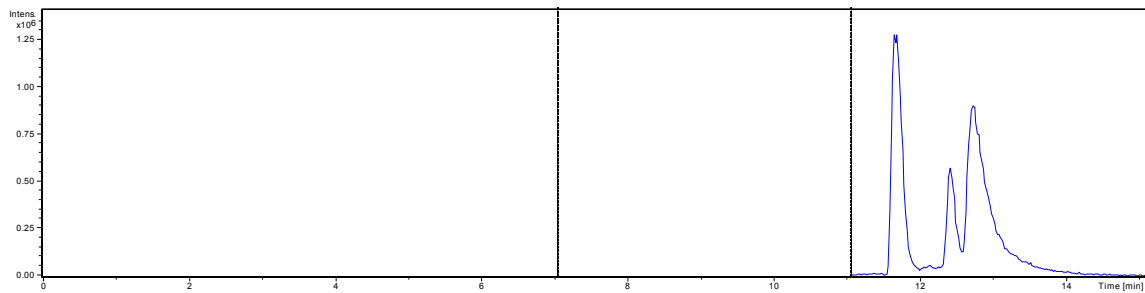


Abbildung 114: EIC ($m/z = 317$) einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H_2O . Die Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.

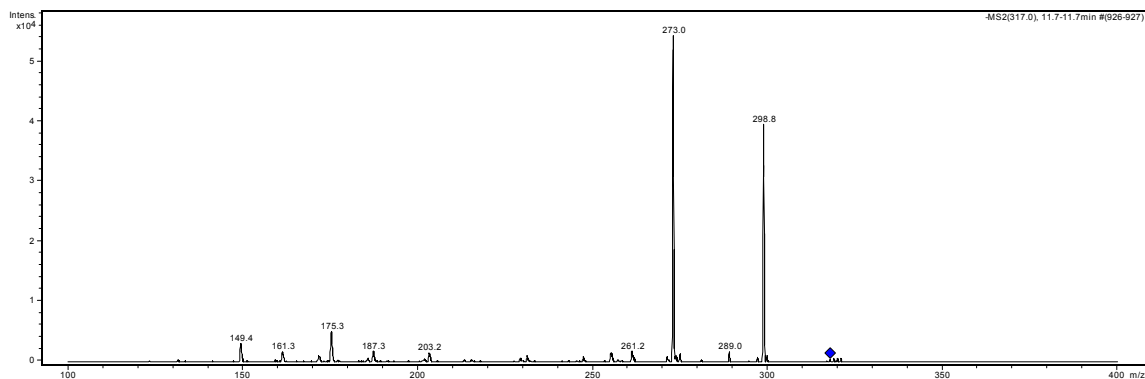


Abbildung 115: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H_2O .

Die Retentionszeiten von DON und ZON in den EIC – Chromatogrammen der Standardlösungen und der Eluate stimmten überein. Im MS2 – Spektrum der DON – Standardlösung wurden die zwei intensivsten Fragmentationen bei 264,8 und 246,9 m/z beobachtet, weitere Fragmentationen bei 277,8; 228,9; 216,9; 202,9 und 137,9. Diese Fragmentationen wurden mit derselben Intensität auch im Spektrum der ungespiketen Weizenschrotprobe gefunden.

Auch bei der ZON – Kalibrierlösung und im Eluat der Weizenschrotprobe wurde im MS2 – Spektrum das selbe Fragmentierungsmuster mit den zwei intensivsten Fragmentationen mit einem m/z von 298,8 und 273,0 und weiteren 7 Fragmentationen, deren Intensität wesentlich geringer war als die der Hauptfragmentationen, (m/z von 289,0; 261,2; 203,2; 187,3; 175,3; 161,3 und 149,4) beobachtet. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die Weizenprobe tatsächlich DON und ZON enthielt.

Weiters wurde ein Eluat nach Aufarbeitung einer Weizenmehlprobe, die mit 2 000 μg DON / kg Probe und 400 μg ZON / kg Probe gespiket war, in das LC / MS System injiziert. Die Spikelevels wurden aus dem Grund so hoch gewählt, damit sie über den höchsten gesetzlichen Grenzwerten (1750 μg DON / kg für unverarbeiteten

Hartweizen und Hafer und 100 µg ZON / kg für unverarbeitetes Getreide außer Mais) lagen. Die qualitative Bestimmung erfolgte anhand des Vergleichs von EIC und den dazugehörigen MS2 Spektren einer DON und ZON – hältigen Standardlösung und eines Eluats der gespiketen Weizenmehlprobe. Zur quantitativen Bestimmung wurde die bereits aufgestellte Kalibriergerade (siehe Kap. 4.2.11) herangezogen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Quantifizierung von DON und ZON mittels LC / MS.

Methode	DON [µg / kg]	ZON [µg / kg]
LC / MS	1922	371
Wiederfindung [%]	96	93

Die erhaltenen Ergebnisse der Wiederfindungen von DON und ZON bestätigen die Richtigkeit der Ergebnisse die mit den HPLC – Systemen 1–1 und 2–2 erhalten worden sind.

Für DON ergab sich eine Nachweisgrenze von 208 µg / kg Weizenmehlprobe, für ZON eine Nachweisgrenze von 43 µg / kg Weizenmehlprobe. Bei der Berechnung der Nachweisgrenze wurde die in der Tabelle 34 angeführte Wiederfindung berücksichtigt.

5 Experimenteller Teil

5.1 HPLC

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere HPLC – Systeme verwendet. Für die Bestimmung von DON wurde das HPLC – System 1–1 eingesetzt. Die Detektion von DON erfolgte mit einem UV – Detektor bei 220 nm. ZON wurde mit den HPLC – Systemen 2–1 und 2–2 analysiert. ZON wurde mit einem Fluoreszenzdetektor detektiert, die Anregungswellenlänge betrug 330 nm, die Emissionswellenlänge 460 nm. Die Bestimmung von mit DON – AK – kreuzreagierenden Verbindungen und ZON – Metaboliten erfolgte unter den gleichen Bedingungen.

In der Tabelle 35 sind die Komponenten der Systeme und die angewendeten chromatographischen Bedingungen zusammengefasst.

Tabelle 35: HPLC – Systeme.

System	1–1	2–1	2–2
Pumpe	Merck–Hitachi LaChrom L–7 100	Merck–Hitachi LaChrom L–7 100	Merck–Hitachi, L–6200 intelligent Pump
Injektor	Rheodyne	Rheodyne	Rheodyne
Schleife	100 µl	100 µl	100 µl
Säule	Phenomenex, Synergi 4u Polar–RP, 80 Å Packungsmaterial: 4 µm, Innendurchmesser: 4,6 mm, Länge: 25 cm	ACE –111–1502, Packungsmaterial: Silica–C–18, 3 µm, 100 Å Innendurchmesser: 3 mm, Länge: 15 cm	ACE –111–1502, Packungsmaterial: Silica–C–18, 3 µm, 100 Å Innendurchmesser: 3 mm, Länge: 15 cm
Mob. Phase	ACN : MeOH : H ₂ O _{bd} = 10 : 10 : 80 (v : v : v)	ACN : H ₂ O _{bd} = 45 : 55 (v : v)	ACN : H ₂ O _{bd} = 45 : 55 (v : v)
Fluss	1 ml / min	0,4 ml / min	0,4 ml / min
Elution	Isokratisch	Isokratisch	Isokratisch
Detektor	Merck–Hitachi UV Detektor L–4000	Merck–Hitachi, F–1080, Fluoreszenz Detektor	Merck–Hitachi, F–1080, Fluoreszenz Detektor
Ofen	W.O.Electronics column thermostat BFO–04	W.O.Electronics column thermostat BFO–04	Merck–Hitachi column oven 655 A–52
Ofentemp.	25 °C	25 °C	25 °C
Software	McDacq	McDacq	Stratos

5.1.1 Chromatographische Bedingungen bei der Detektion von DON und ZON mittels LC / MS

Die Zusammensetzung der LC / MS – Apparatur ist in der Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: LC –MS Apparatur.

Degasser	Hewlet Packard Series 1100
Pumpe	Hewlet Packard Series 1100
Autosampler	Hewlet Packard Series 1100
Schleife	30 µl
Säule	AC –111–1502, Packungsmaterial: Silica–C–18, 3 µm, 100 Å, Innendurchmesser: 2 mm, Länge: 15 cm
UV – Detektor	Agilent VDW G1314A
Fluss	0,2 ml / min
Mobile Phase	ACN : H ₂ O _{bd}
Elution	Gradient
MS	Bruker Daltonics HTC Plus
Ionenquelle	ESI
N ₂ –Versorgung	Dominick Hunter – Nitrox–UHPLCMS 18
Pressluft	Junair
Vakuumpumpe	Edwards 18

Zuerst wurde eine LC / MS Methode zur Bestimmung von DON allein entwickelt. Der HPLC – Gradient ist in der Tabelle 37 wiedergegeben.

Tabelle 37: Gradient zur Bestimmung von DON (LC / MS – System).

t [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
5	95	5
15	85	15

A: H₂O

B: ACN

Um DON und ZON gleichzeitig bestimmen zu können, wurde eine neue LC / MS Methode entwickelt. Der bei dieser Methode angewendete Gradient ist in der Tabelle 38 angeführt.

Tabelle 38: Gradient zur Bestimmung von DON / ZON (LC / MS – System).

t [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
1	100	0
5	10	90
12	10	90
13	100	0
25	100	0

A: H₂O

B: ACN

5.1.1.1 Einstellung der Ionenfalle zur Detektion von DON und ZON

Bei der Bestimmung von DON blieben die Einstellungen der ESI und der Ionenfalle für die gesamte Messdauer unverändert, sie sind in der Tabelle 39 wiedergegeben. Für die gleichzeitige Detektion von DON und ZON in einem Lauf wurde die Messung in drei Segmente eingeteilt. Im ersten Segment, von 0 bis 8 Minuten, wurde die von der HPLC – Säule kommende mobile Phase vor der Ionenquelle in das Abfallgefäß geleitet. In den beiden anderen Segmenten passierte die mobile Phase die Ionenquelle. Im zweiten Segment, von 8 bis 11 Minuten, wurde DON detektiert, die Retentionszeit von DON betrug 9,5 Minuten. Im dritten Segment, von 11 bis 15

Minuten, wurde ZON detektiert, das eine Retentionszeit von 11,7 Minuten aufwies. Die Einstellungen der ESI und der Ionenfalle sind in der Tabelle 39 wiedergegeben.

Tabelle 39: Einstellungen der ESI und der Ionenfalle zur Detektion von DON und ZON.

Parameter	DON	ZON
Capillary Voltage	+4200V	+4200V
End Plate Offset	–500V	–500V
Nebulizer [psi]	40	40
Dry Gas [l / min]	10	10
Dry Temp [°C]	300	300
Polarity	Neg	Neg
Smart Target	250000	25000
Max.Accu Time [ms]	20	25
Scan [m / z]	100–400	100–400

5.1.2 Herstellung von PBS (pH 7,6)

Für 2,5 L PBS wurden 3,9 g Natriumdihydrogenphosphat, 31,15 g Dinatriumhydrogenphosphat und 21,25 g Natriumchlorid eingewogen und in H₂O_{bd} gelöst.

5.1.3 Standardlösungen für DON und eventuell mit den DON – Antikörpern kreuzreagierende Verbindungen

Zur Herstellung einer DON – Stammlösung wurden 10,0 mg DON eingewogen und in 10,0 ml ACN gelöst. Diese Lösung wurde photometrisch standardisiert. Dazu wurde die Stammlösung mit ACN 1 : 4 verdünnt und in eine Quarzküvette eingefüllt. Danach wurde die Extinktion gegen ACN bei 218 nm achtmal gemessen, wobei die Küvette zwischen jeder Messung herausgenommen, geschüttelt und um 90 ° verdreht wurde.

Die Konzentration wurde nach dem Lambert – Beer Gesetz berechnet:

$$c[\mu g \cdot ml^{-1}] = \frac{E \times Mr \times 1000 \times f}{\epsilon \times d} = \frac{A \times 296,3 \times 1000 \times 4}{6825 \times 1}$$

E.....Gemessene Extinktion

Mr...Molmasse von DON

f.....Verdünnungsfaktor

ϵMolarer Extinktionskoeffizient von DON in ACN

d.....Optische Schichtdicke

Aus der standardisierten DON – Stammlösung wurden durch Verdünnen mit PBS Standardlösungen im Bereich von 50 bis 1000 ng / ml hergestellt.

Im Laufe der Arbeit wurde eine standardisierte Kalibrierlösung mit einer Konzentration von 100,8 μg / ml in ACN von der Firma Biopure gekauft. Stammlösungen von eventuell mit den Antikörpern kreuzreagierenden Verbindungen wurden von Prof. Razzazi – Fazeli von der Veterinärmedizinischen Universität Wien erhalten. Es handelte sich dabei um folgende Verbindungen:

Deepoxy – DON (DOM)

3 – Acetyl – DON (3 – A – DON)

15 – Acetyl – DON (15 – A – DON)

Die Reinsubstanzen zur Herstellung der Stammlösungen stammten ebenfalls von der Firma Biopure. Alle Stammlösungen lagen in ACN vor. Ihre Konzentrationen betrugen: DOM: 25,5 μg / ml, 3 – A – DON: 100,4 μg / ml und 15 – A – DON: 100,6 μg / ml.

Aus den Stammlösungen wurden durch Verdünnen mit PBS Kalibrationslösungen im Bereich von 50 bis 300 ng / ml hergestellt.

Alle Kalibrationslösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und waren einige Wochen lang stabil.

5.1.4 Standardlösungen für ZON und eventuell mit ZON – AK kreuzreagierende Verbindungen

Zur Herstellung einer ZON – Stammlösung haben wurden 5,0 mg ZON eingewogen und in 5,0 ml ACN gelöst. Diese Lösung wurde photometrisch standardisiert. Dazu

wurde die Stammlösung mit ACN 1 : 10 verdünnt und in eine Quarzküvette eingefüllt. Danach wurde die Extinktion gegen ACN bei 272 nm achtmal gemessen, wobei die Küvette zwischen jeder Messung herausgenommen, geschüttelt und um 90 ° verdreht wurde. Die Konzentration wurde nach dem Lambert – Beer Gesetz berechnet:

$$c[\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = \frac{E \times Mr \times 1000 \times f}{\epsilon \times d} = \frac{E \times 318,4 \times 1000 \times 10}{12623 \times 1}$$

E.....Gemessene Extinktion

Mr....Molmasse von ZON

f.....Verdünnungsfaktor

ϵMolarer Extinktionskoeffizient von ZON in ACN

d.....Optische Schichtdicke

Aus der standardisierten ZON – Stammlösung wurden durch Verdünnen mit H₂O_{bd} Kalibrationslösungen im Bereich von 1 bis 150 ng / ml hergestellt.

Von Prof. Razzazi – Fazeli von der Veterinärmedizinischen Universität Wien wurde eine Standardlösung erhalten, die ZON und die folgenden ZON – Metabolite enthielt:

α – Zearalenol (α – ZOL), β – Zearalenol (β – ZOL), Zearalanon (ZAN), α – Zearalanol (α – ZAL) und β – Zearalanol (β – ZAL).

Die Substanzen waren in MeOH : ACN : H₂O_{bd} 35 : 30 : 35 (v : v : v) gelöst. Die Substanzen zur Herstellung dieser Stammlösungen stammten von der Firma Sigma. Die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 40: Zusammensetzung der Standardlösung, die ZON und ZON – Metabolite enthielt.

Verbindung	Konzentration [ng / ml]
ZON	15
α – ZOL	10
β – ZOL	100
ZAN	60
α – ZAL	50
β – ZAL	80

5.2 Sol – Gel Immunaффinitätschromatographie

5.2.1 Verwendete Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper aus Indonesien (Zheng Zhong Ming, Singapore) verwendet.

Die DON – Antikörper wurden in verschiedenen konzentrierten Lösungen geliefert, 1 mg / ml bzw. 5,56 mg / ml. Die Antikörperlösungen mit einer Konzentration von 1 mg / ml wurden ohne Vorbehandlung in 1 ml Fraktionen bei – 18 °C gelagert. Die Antikörperlösungen mit einer Konzentration von 5,56 mg / ml wurden auf 4 mg / ml mit PBS verdünnt und in 0,5 ml Aliquoten bei – 18 °C gelagert.

Bei den ZON – Antikörpern standen zwei Klone (Klon 1 und Klon 2) zur Verfügung. Beide ZON – Antikörperlösungen hatten eine Konzentration von 8,32 mg / ml. Sie wurden in 0,5 ml Fraktionen bei – 18 °C gelagert.

Die benötigte Menge an Antikörperlösung wurde immer erst unmittelbar vor Verwendung aufgetaut. Unverbrauchte AK – Lösungen wurde nicht mehr tief gefroren, sondern bei 4 °C gelagert und sobald wie möglich verbraucht.

War eine Reduktion des Volumens der Antikörperlösung notwendig (z. B. beim Co-immobilisieren von DON und ZON – Antikörpern in 0,5 g Sol – Gel – Glas), so wurde die Antikörperlösung in einer Immunfiltrationseinheit (IFE) (Amicon Ultra – 4, 30 000 MWCO, Millipore) wiederholt 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert, bis das Volumen auf die gewünschte Menge reduziert war. Die IFE wurde einmal mit 3 bis 5 Tropfen PBS nachgewaschen. Sowohl die aufkonzentrierte AK – Lösung als auch die Waschlösungen wurden zur immobilisierung der Antikörper verwendet.

5.2.2 Herstellung der Sol – Gel – Säulen

Benötigte Lösungen:

DON – AK – Lösung

ZON – AK – Lösung

Unspezifische Antikörper aus Kaninchen

H₂O_{bd}

0,04 M HCl

PBS

Tetramethoxysilan (TMOS)

ACN:H₂O, 40:60 (v:v)

5.2.2.1 Herstellung des Hydrolysats

0,4 ml 0,04 M HCl, 1,5 ml H₂O_{bd} und 6,8 ml TMOS wurden in ein Becherglas pipettiert, das Becherglas mit Parafilm verschlossen, geschwenkt und für 30 Minuten im Ultraschallbad bei voller Leistung und Eiskühlung beschallt.

5.2.2.2 Herstellung der IAS

Ein leeres Becherglas (Volumen 250 – 400 ml) wurde abgewogen und ein Aliquot des zu immobilisierenden Antikörpers aufgetaut. In das Becherglas wurde die zu immobilisierende Menge an Antikörper in PBS und das gleiche Volumen an Hydrolysat pipettiert (z.B. für 1 g Glas 1 ml Antikörperlösung in PBS und 1 ml Hydrolysat). In Rahmen der Dissertation wurden Säulen mit unterschiedlichen Mengen an Sol – Gel – Glas und Antikörper hergestellt. Die genauen Mengenangaben sind in der Tabelle 41 angeführt:

Tabelle 41: Herstellung der IAS.

DON – AK [mg]	ZON – AK, Klon: 1 [mg]	ZON – AK, Klon: 2 [mg]	Unspezifische bzw. keine Antikörper	PBS [ml]	Hydrolysat [ml]
0,5	–	–	–	0,5	1
1	–	–	–	0	1
2	–	–	–	0	1
2	–	–	–	0	0,5
–	0,8	–	–	0,4	0,5
–	1,7	–	–	0,3	0,5
–	4,2	–	–	0	0,5
–	–	0,8	–	0,4	0,5
–	–	1,7	–	0,3	0,5
–	–	2,5	–	0,2	0,5
–	–	4,2	–	0	0,5
0,5	–	0,8	–	0,3	0,5
2	–	4,2	–	0	0,5
–	–	–	1	0	1
–	–	–	0,5	0	0,5
–	–	–	–	1	1
–	–	–	–	0,5	0,5

Nach der Zugabe des Hydrolysats und der Antikörperlösung wurde das Becherglas geschwenkt und wieder abgewogen. Danach wurde das Becherglas bei Raumtemperatur offen stehen gelassen und die 50 % Gewichtsabnahme des Gels abgewartet. Anschließend wurde das Sol – Gel – Glas in einer Achatreibschale grob zermahlen und in eine 3 ml Säule, ausgestattet mit einer PTFE Fritte, gefüllt. Es wurden entweder Glassäulen von Merck oder Kunststoffsäulen (gebrauchte, gereinigte DONPREP – Säulen) verwendet. Die Säule wurde mit 20 ml PBS gewaschen, die Luftblasen im Säulenbett wurden durch Aufwirbeln mit einer Spatel entfernt. Danach wurden die Säulen zuerst mit 15 ml 40 % ACN und anschließend mit 20 ml PBS gespült und in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.3 Reinigung der gebrauchten DONPREP – Säulen

Benötigte Lösungen:

ACN

H₂O_{bd}

Die Säulen wurden so lange offen bei RT liegen gelassen, bis das Packungsmaterial vollständig ausgetrocknet war. Danach wurde die obere Fritte mit Hilfe einer Spatel aufgestellt und das Packungsmaterial entfernt. Die leere Säule wurde mehrmals mit Wasser gespült, danach in ACN für 15 min im Ultraschallbad beschallt und anschließend wieder mit Wasser und zum Schluss mit H₂O_{bd} gespült. So gereinigte Säulen wurden mit Sol – Gel – Glas gepackt.

5.2.4 Lagerung, Konditionierung und Regenerierung der Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

PBS

Nach jeder Verwendung wurden die Immunaффinitätssäulen mit 20 ml PBS regeneriert. Danach konnten die Säulen wieder verwendet werden. Die Lagerung der Säulen erfolgte in PBS bei 4 °C. Vor der ersten Verwendung an einem Tag wurden die Säulen aus dem Kühlschrank genommen und ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden sie mit 20 ml PBS gespült. So behandelt, war die Säule für die Aufarbeitung von Proben bereit.

5.2.5 Auswahl verwendbarer Materialien – Prüfung auf Adsorption von ZON

5.2.5.1 Glas – und Kunststoffsäulchen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

H_2O_{bd}

ACN: H_2O , 40:60 (v:v)

PBS

Es wurde ein „leeres“ Sol – Gel – Glas ohne Antikörper hergestellt (siehe Kap. 5.2.2). In eine Glassäule, eine gebrauchte DONPREP – Säule, die nach der Entfernung des Packungsmaterials sorgfältig gereinigt worden war (siehe Kap. 5.2.3), und eine weitere Kunststoffsäule – wurde 1 g Sol – Gel – Glas gefüllt. Die Säulen wurden mit 20 ml PBS gewaschen und danach mit 5 ml einer ZON – Standardlösung mit einer Konzentration von 100 ng / ml beschickt. Danach wurden die Säulen mit 5 ml H_2O_{bd} gewaschen und ZON mit 5 ml 40 % ACN eluiert. Während des ganzen Prozesses wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und ihre ZON – Konzentration mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

5.2.5.2 Glas – und Kunststoffgefäße

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

70 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

50 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

20 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

10 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

5 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

1) Ein 10 ml Glasmesskolben, ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und ein 20 ml Szintillationsfläschchen (die letzten aus Polypropylen) wurden gemäß ihrer Nennvolumina mit der 100 ng / ml ZON – Standardlösung befüllt und für 2 Wochen im Kühlschrank stehen gelassen. Danach wurden die ZON – Konzentrationen in diesen Gefäßen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

2) Jeweils 1 ml jeder ZON – Standardlösung wurde in je ein 15 ml Glas – und ein 15 ml Polykarbonatröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden verschlossen und bei 4 °C 3 Tage lang gelagert. Nach drei Tagen wurden die ZON – Konzentrationen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

5.2.6 Optimierung der Aufgabegeschwindigkeit

5.2.6.1 DON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN:H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Auf die Säule wurden 5 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung aufgebracht. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN in einen 5 ml Messkolben eluiert. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die Fließgeschwindigkeit wurde während des ganzen Prozesses mit einer Pumpe auf 0,5, 1, 1,5 bzw. 2 ml / min eingestellt. Die DON – Konzentrationen in den Eluatzen wurden mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.2.6.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

H_2O_{bd}

ACN:H₂O, 50:50 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2,5 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Auf diese Säule wurden 5 ml einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung aufgebracht. Dabei wurde die Fließgeschwindigkeit mit einer Pumpe auf 0,5, 1, 1,5 bzw. 2 ml / min eingestellt. Die Säule wurde mit 5 ml H_2O_{bd} gewaschen. ZON wurde mit 4 ml 50 % ACN in einen 5 ml Messkolben eluiert und der Kolben mit H_2O_{bd} auf 5 ml aufgefüllt. Während des Waschens und während der Elution wurde eine Fließgeschwindigkeit von 5 bzw. 2 ml / min angewendet. Die ZON – Konzentrationen wurden mittels des HPLC Systems 2–1 bestimmt.

5.2.7 Einfluss der MeOH – Konzentration in der Waschlösung auf die Wiederfindung von ZON

Benötigte Lösungen:

50 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O_{bd}

H_2O_{bd}

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

MeOH : H₂O, 20:80 (v:v)

MeOH : H₂O, 30:70 (v:v)

MeOH : H₂O, 40:60 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2,5 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Auf diese Säule wurden 5 ml einer 50 ng / ml ZON – Standardlösung aufgebracht. Danach wurde sie mit 5 ml einer Waschlösung gewaschen und ZON mit 4 ml 50 % ACN eluiert. Das Eluat wurde mit H₂O_{bd} auf 5 ml aufgefüllt und die ZON – Konzentration mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

5.2.8 Einfluss des Aufgabevolumens und der Aufgabekonzentration auf die Wiederfindung

5.2.8.1 DON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

25 ng / ml DON Standardlösung in PBS

50 ng / ml DON Standardlösung in PBS

75 ng / ml DON Standardlösung in PBS

100 ng / ml DON Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Auf die Säule wurden 300 ng DON in unterschiedlichen Konzentrationen und Volumina aufgebracht (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Aufgabevolumen in Anhängigkeit von der DON – Konzentration.

DON – Konzentration [ng / ml]	Aufgabevolumen [ml]
25	12
50	6
75	4
100	3

Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN in einen 5 ml Messkolben eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 1 ml / min. Die DON – Konzentration wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.2.8.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

25 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

250 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

500 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2,5 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Auf die Säule wurden 500 ng ZON in unterschiedlichen Konzentrationen und Aufgabevolumina aufgebracht (siehe Tabelle 43).

Tabelle 43: Aufgabevolumen in Abhängigkeit von der ZON – Konzentration.

Standardkonzentration [ng / ml]	Aufgabevolumen [ml]
25	20
100	5
250	2
500	1

Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen. ZON wurde mit 4 ml 50 % ACN in einen 5 ml Messkolben eluiert und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die ZON – Konzentration wurde mittels des HPLC Systems 2–2 bestimmt.

5.2.9 Einfluss des Elutionsmittels auf die Wiederfindung

5.2.9.1 DON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON Standardlösung in PBS

PBS

ACN : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 20:80 (v:v)

ACN : H₂O, 30:70 (v:v)

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

H₂O_{bd}

MeOH

Eine Immunaффinitätssäule, in der 1 mg DON – AK immobilisiert war, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 10 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen.

Bei Versuchen mit ACN – hältigen Elutionsmitteln wurde DON mit 5 ml Elutionsmittel eluiert. Bei der Elution wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 1 ml / min. Bevor die DON – Konzentration im Eluat mittels HPLC bestimmt werden konnte, wurden die 20 %, 30 %, bzw. 40 % ACN hältigen Eluate 1:2, 1:3 bzw. 1:4 mit PBS verdünnt.

In den Versuchen, in denen MeOH verwendet wurde, wurde DON mit 3 ml MeOH eluiert. Bei der Elution wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Bevor die DON – Konzentration in den Eluatfraktionen bestimmt werden konnte, wurde MeOH im Stickstoffstrom entfernt und das Volumen mit Wasser auf 0,5 ml eingestellt. Nach der Elution mit MeOH wurde die Säule nicht mehr regeneriert, sondern verworfen.

Die DON – Konzentrationen in den verschiedenen Fraktionen wurden mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.2.9.2 ZON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

H₂O_{bd}

Zwei Immunaффinitätssäulen, in denen jeweils 4,2 mg ZON – AK des Klons 1 bzw. 2 immobilisiert waren, wurden für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 5 ml einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen. ZON wurde mit 10 ml eines Elutionsmittels eluiert. Als Elutionsmittel wurden ACN – Wasser Lösungen mit 40 %, 50 %, bzw. 60 % ACN verwendet. Während der Elution wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Zur Messung wurde bei den Fraktionen, die durch Elution mit 50 % bzw. 60 % ACN gewonnen wurden, ACN im Stickstoffstrom eingeeengt und der 1 ml Messkolben bis zur Ringmarke aufgefüllt. Die ZON – Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurden mittels des HPLC Systems 2–1 bestimmt.

5.2.9.3 Fraktionierte Elution bei der DON / ZON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON, 100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

PBS

ACN : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 20:80 (v:v)

ACN : H₂O, 30:70 (v:v)

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

H₂O_{bd}

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Danach wurde sie mit 5 ml einer Standardlösung, die 100 ng / ml DON und 100 ng / ml ZON enthielt, beladen. Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml 10 % MeOH. Anschließend wurde die Säule mit 1 ml Portionen des jeweiligen Elutionsmittels eluiert und dabei 1 ml Fraktionen gesammelt, und zwar so lange, bis kein Analyt mehr im Eluat feststellbar war. Als Elutionsmittel wurden ACN – Wasser Lösungen mit 10 %, 20 %, 30 % bzw. 40 % ACN verwendet. Die DON – und ZON – Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen wurden durch Injektion in beide HPLC – Systeme (1–1 und 2–2) bestimmt.

5.2.10 Durchbruchskurven – Bestimmung der Säulenkapazität

5.2.10.1 DON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON Standardlösung in PBS

PBS

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 10 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen. DON wurde mit 5 ml 40 % ACN von der Säule eluiert. Die Aufgabegeschwindigkeit betrug 1 ml / min. Während der Aufgabe wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die DON – Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurden mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt.

5.2.10.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

Zwei Immunaффinitätssäulen, in denen 4,2 bzw. 1,7 mg ZON – AK des Klons 2 oder 1,7 bzw. 0,8 mg ZON – AK des Klons 1 immobilisiert waren, wurden für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 1 ml Portionen einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung auf die Säule aufgebracht. Gleichzeitig wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und sofort die ZON – Konzentration mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt. Das Auftragen der Standardlösung erfolgte so lange, bis ein Durchbruch von ZON beobachtet wurde. Danach wurden die Säulen mit 10 ml H₂O_{bd} gewaschen. ZON wurde mit 10 ml 40 % ACN von der Säule eluiert. Beim Waschen der Säule und auch während der Elution von ZON wurden ebenfalls 1 ml Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden die ZON – Konzentrationen in diesen Fraktionen mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

5.2.10.3 DON / ZON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

500 ng / ml DON, 500 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK und 0,8 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Diese wurde mit 5 ml einer Standardlösung, die 500 ng / ml DON und 500 ng / ml ZON enthielt, überladen. Danach wurde die Säule mit 5 ml 10 % MeOH gewaschen und die Analyte mit 4 ml 50% ACN eluiert. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom

entfernt und das Endvolumen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 5 ml eingestellt. Das Eluat wurde sowohl in das HPLC – System 1–1 als auch in das HPLC – System 2–2 injiziert.

5.2.11 Einfluss des Aufgabemediums auf die Wiederfindung

5.2.11.1 DON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON Standardlösung in PBS

100 ng / ml DON Standardlösung in 5 % ACN

100 ng / ml DON Standardlösung in 10 % ACN

PBS

ACN : H_2O , 40:60 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 10 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung (in PBS, 5 % ACN bzw. 10 % ACN) auf die Säule aufgebracht und gleichzeitig 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen und ebenfalls 1 ml Fraktionen gesammelt. DON wurde mit 5 ml 40 % ACN von der Säule eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug während der ganzen Prozedur 1 ml / min. Die DON – Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurden mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt.

5.2.11.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml ZON Standardlösung in H_2O

100 ng / ml ZON Standardlösung in PBS

100 ng / ml ZON Standardlösung in 10 % ACN

100 ng / ml ZON Standardlösung in 20 % ACN

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$

ACN : H_2O , 50:50 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 5 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung (in H₂O, 5 % ACN, 10 % ACN bzw. 20 % ACN) auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit 10 ml H₂O_{bd} gewaschen und ZON anschließend mit 4 ml 50 % ACN von der Säule eluiert. Der Kolben wurde mit H₂O_{bd} auf 5 ml aufgefüllt und die ZON – Konzentration mittels des HPLC – Systems 2–1 bestimmt.

5.2.12 Einfluss des pH – Wertes der Aufgabelösung auf die Wiederfindung

5.2.12.1 DON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

1mg / ml DON – Standardlösung in ACN

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

Verdünnte NaOH – Lösung

Verdünnte HCl – Lösung

Es wurden 100 ng / ml DON Standardlösungen in PBS mit einem pH – Wert von 5, 6, 7 oder 8 hergestellt. Währenddessen wurde eine Immunaффinitätssäule, in der 1 mg DON – AK immobilisiert waren, für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Jeweils 5 ml der Standardlösung wurden auf die Säule aufgegeben, die Säule wurde mit 15 ml H₂O_{bd} gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 40 % ACN eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.2.12.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

1 mg / ml ZON – Standardlösung in ACN

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

PBS

Verdünnte NaOH – Lösung

Verdünnte HCl – Lösung

Es wurden 100 ng / ml ZON Standardlösungen in PBS mit einem pH – Wert von 5, 6, 7 oder 8 hergestellt. Währenddessen wurden Immunaффinitätssäulen, in denen 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Jeweils 5 ml der Standardlösung wurden auf die Säule aufgegeben, die Säule wurde mit 15 ml H₂O_{bd} gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Kolben mit H₂O_{bd} auf 5 ml aufgefüllt. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 2–2 bestimmt.

5.2.13 Retentionsmechanismus in Sol – Gel Säulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON Standardlösung in PBS

100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

H₂O_{bd}

PBS

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

Für diesen Versuch wurden zwei IAS (eine mit unspezifischen Antikörpern aus Kaninchen und eine ohne Antikörper) hergestellt (Kap. 5.2.2). Gleichzeitig wurden

auch eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK und eine Immunaффinitätssäule, in der 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, getestet. Auf jede Säule wurden 5 ml einer 100 ng / ml DON – bzw. ZON – Standardlösung aufgebracht und gleichzeitig 1 ml Fraktionen gesammelt. Bei den Versuchen mit DON wurden die Säulen mit 5 ml PBS gewaschen und dabei wieder 1 ml Fraktionen gesammelt. DON wurde mit 5 ml 40 % ACN eluiert und ebenfalls 1 ml Fraktionen gesammelt. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 1 ml aufgefüllt. Die Fließgeschwindigkeit während des ganzen Prozesses betrug 1 ml / min. Bei den Versuchen mit ZON wurden die Säulen mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen. ZON wurde mit 10 ml 40 % ACN eluiert. Sowohl beim Waschen als auch bei der Elution wurden wiederum 1 ml Fraktionen gesammelt. Die DON – und ZON – Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurden mittels der HPLC Systeme 1–1 und 2–1 bestimmt.

5.2.14 Bestimmung der Kreuzreaktivität in der DON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

100 ng / ml DOM – Standardlösung in PBS

100 ng / ml 15 – Acetyl – DON – Standardlösung in PBS

100 ng / ml 3 – Acetyl – DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

PBS

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 ml einer Lösung, die 100 ng / ml der auf Kreuzreaktivität zu testenden Verbindung enthielt, wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen und die Verbindung anschließend mit 4 ml 40 % ACN in einen Messkolben eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die

Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 1 ml / min. Die Konzentrationen wurden mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt. Um die Wiederfindungen genau ermitteln zu können, wurde auch die auf die Immunaффinitätssäule aufgegebene Standardlösung injiziert.

5.2.15 Bestimmung der Wiederfindung in den Immunaффinitätssäulen

5.2.15.1 DON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,5, 1, oder 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 40 % ACN eluiert. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des Aufgabeschrittes 1 ml / min. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.2.15.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

50 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 0,8, 1,7 oder 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 ml einer 50 ng / ml ZON – Standardlösung (für Säulen mit 0,8 mg ZON – AK) oder 5 ml einer 100 ng / ml ZON – Standardlösung (für Säulen mit 1,7 oder 4,2 mg ZON – AK) wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen und ZON anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert. Das Endvolumen wurde mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 2–1 oder 2–2 bestimmt. Um die Wiederfindung genau ermitteln zu können, wurde auch die auf die Immunaффinitätssäule aufgegebene Standardlösung injiziert. Die Wiederfindung ergibt sich aus dem Verhältnis der ZON – Konzentration im Eluat zu jener in der Standardlösung.

5.2.15.3 DON/ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON, 100 ng / ml ZON Standardlösung in H₂O_{bd}

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 ml einer Standardlösung, die 100 ng / ml DON und 100 ng / ml ZON enthielt, wurden auf die Säulen aufgegeben. Die Säulen wurden mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen und DON bzw. ZON anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Kolben mit H₂O_{bd} auf 5 ml aufgefüllt. Die DON – bzw. ZON – Konzentrationen im Eluat wurden mittels der HPLC – Systeme 1–1 bzw. 2–2 bestimmt. Um die Wiederfindung genau ermitteln zu können, wurde auch die auf die Immunaффinitätssäule aufgegebene Standardlösung in beide HPLC – Systeme injiziert.

5.3 Aufarbeitung von Realproben

5.3.1 Realproben

Es wurden drei verschiedene Probenmatrizes untersucht: Weizen, Mais und Hartweizenspaghetti.

Bei den Weizenproben handelte es sich um ein DON – und ZON – freies Weizenmehl, welches in einem lokalen Supermarkt gekauft worden war, und einen DON – und ZON – belasteten Weizenschrot mit einer nicht genau definierten DON – bzw. ZON – Konzentration, der von Prof. Razzazi – Fazeli von der Veterinärmedizinischen Universität Wien stammte.

Bei den Maisproben handelte es sich um ein DON – belastetes Maismehl mit einer geringen, nicht genau definierten DON – Konzentration, welches ebenfalls von der Veterinärmedizinischen Universität Wien stammte, und ein zertifiziertes Referenzmaterial von der Firma Biopure mit einer genau definierten DON – Konzentration von $474 \pm 30 \mu\text{g} / \text{kg}$.

Bei den Hartweizenteigwaren handelte es sich um Spaghetti (aus dem ganzen Korn von Hartweizen und Dinkel), die in einem lokalen Supermarkt gekauft worden waren und nicht mit DON kontaminiert waren.

5.3.2 Extraktion von DON und ZON aus Realproben

5.3.2.1 Extraktion von DON

Benötigte Lösungen:

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$

5 g einer gemahlenden Probe wurden eingewogen und mit 40 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicatifritte (Porosität 5) in eine Saugflasche

filtriert. Ein Aliquot des Filtrates wurde anschließend entweder mittels Immunaффinitätschromatographie oder Festphasenextraktion aufgearbeitet.

5.3.2.2 Extraktion von ZON

Benötigte Lösungen:

PBS

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

Die Extraktion erfolgte gemäß der Gebrauchsanweisung für ZEARASTAR – Säulchen der Firma Romerlabs. 5 g einer gemahlenen Probe wurden eingewogen und mit 20 ml 60 % ACN versetzt. Die Probensuspension wurde 1 h unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Danach wurde durch ein Blaubandfilter filtriert. 4 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 25 ml aufgefüllt und auf die Immunaффinitätssäule aufgegeben

5.3.2.3 Extraktion von ZON mittels „Accelerated Solvent Extraction“

Benötigte Lösungen:

MeOH

PBS

ACN / MeOH, 50:50 (v:v)

Die Extraktion erfolgte gemäß der Gebrauchsanweisung für die ASE – Apparatur der Firma Dionex.

Die 10 ml Extraktionszelle wurde mit einer Bodenfritte und einem Cellulosefilter versehen und mit einer Probe (ca. 7,5 g) befüllt. Anschließend wurde die Zelle mit der oberen Fritte verschlossen, in die vorgeheizte ASE eingespannt und die Extraktion gestartet.

Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus ACN / MeOH, 50:50 (v:v) verwendet. Die Ofentemperatur wurde auf 80 °C eingestellt, der Druck betrug während des ganzen Prozesses 1500 psi. Es wurde eine Aufwärmzeit von 5 Minuten gewählt, danach erfolgte die Extraktion für 5 Minuten. Diese wurde zweimal durchgeführt. Gewaschen

wurde mit 7,5 ml der Extraktionslösung (das entspricht 75% Zellvolumen), die Purge – Zeit wurde auf 100 Sekunden eingestellt. Die gesamte Extraktionszeit betrug etwa 15 Minuten, der Lösungsmittelverbrauch etwa 25 ml.

Nach der Prozedur wurde der Extrakt am Rotavapor bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in 1 ml MeOH aufgenommen und das Volumen mit H₂O_{bd} auf 20 ml eingestellt. 5 ml dieser Lösung wurden auf die Immunaффinitätssäule aufgetragen.

5.3.2.4 Aufreinigung von Realproben – mittels Festphasenextraktion

Benötigte Lösungen:

PBS

ACN : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 20:80 (v:v)

ACN

H₂O_{bd}

Die SPE – Säule (Isolute[®] C18–Säule, 3 ml, 500 mg) wurde zuerst mit 6 ml ACN gewaschen und danach mit 6 ml 10 % ACN konditioniert. 5 ml des Probenextrakts wurden mit PBS auf 32 ml verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 10 ml 20 % ACN gewaschen. Die Elution von ZON erfolgte mit 4 ml ACN in einen 5 ml Messkolben. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom auf ca. 2 ml eingengt und der Kolben bis zur Marke mit H₂O_{bd} aufgefüllt. Die SPE – Säulchen wurden nach einer einmaligen Verwendung verworfen.

5.3.3 Überprüfung der Bindungskapazität von DON in Anwesenheit von Matrix

Benötigte Lösungen:

100,8 µg / ml DON – Standardlösung in ACN

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

H₂O_{bd}

MeOH

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer Maisprobe wurden eingewogen und mit 20 µg DON gespiket. Danach wurde die gespikete Probe mit 40 ml Wasser versetzt und für 10 min gerührt. Danach wurden etwa 30 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde, falls nötig, durch ein Blaubandfilter filtriert. 10 ml des Filtrats wurden auf die Immunaффinitätssäule aufgegeben (das entspricht einer DON – Menge von 5000 ng). Die Säule wurde mit 5 ml 10 % MeOH, gewaschen, und DON anschließend mit 1,5 ml MeOH eluiert. MeOH wurde im Stickstoffstrom am Warmwasserbad entfernt und das Volumen auf 1 ml mit H₂O_{bd} eingestellt. Die DON – Konzentration wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt.

5.3.4 Einfluss der ACN – Konzentration im Probenextrakt auf die Wiederfindung von DON und ZON in DON/ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

1 mg / ml DON – Standardlösung in ACN

1 mg / ml ZON – Standardlösung in ACN

H₂O_{bd}

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 25 g einer DON und ZON freien Weizenmehlprobe wurden eingewogen, mit 600 µg DON und 100 µg ZON pro kg Probe gespiket und 1 Stunde am Schüttler unter Lichtausschluss mit 100 ml 60 % ACN extrahiert. Danach wurde der Extrakt durch ein Blaubandfilter filtriert und das Filtrat mit PBS so weit verdünnt, dass die ACN –

Konzentration in der aufgetragenen Lösung 5 % bzw. 2,5 % betrug (siehe Tabelle 44). Vom Extrakt, bei dem die ACN – Konzentration auf 2,5 % herabgesetzt wurde, wurden 120 ml auf die Säule aufgetragen, vom 5 % ACN – hältigen Extrakt 60 ml. Danach wurden die Säulen mit 5 ml 10 % MeOH gewaschen und die Analyte mit 4 ml 50 % ACN von der Säule eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt, das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt und zur Wiederfindungsbestimmung in beide HPLC – Systeme (1–1 und 2–2) injiziert.

Tabelle 44: Verdünnung des Filtrats zur Aufgabe auf die DON/ZON – Immunaффinitätssäule.

Gewünschte ACN – Konzentration in der Auftragslösung [%]	Filtrat [ml]	PBS [ml]	Aufgabevolumen [ml]
2,5	5	115	120
5	5	55	60

5.3.5 Einfluss des Extraktionsmediums auf die Wiederfindung von DON und ZON

Benötigte Lösungen:

1 mg / ml DON – Standardlösung in ACN

H₂O_{bd}

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

PBS

Vier Immunaффinitätssäulen, in denen jeweils 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurden für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Währenddessen wurden zweimal 25 g einer ZON – positiven Weizenprobe eingewogen und mit DON gespiket (Spikelevel 400 µg DON / kg Probe). Diese Proben wurden mit 100 ml 60 % ACN oder 100 ml 60 % MeOH versetzt. Die Probensuspensionen wurden 1 h unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Danach wurde der Überstand durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats

wurden mit PBS auf 32 ml aufgefüllt (ACN Konz. ~ 10 %) und die gesamte Lösung auf je zwei DON/ZON – Immunaффinitätssäulen aufgegeben. Die Säulen wurden mit 10 ml 10 % MeOH gewaschen und die Mykotoxine anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON bzw. ZON – Konzentrationen im Eluat wurden mittels der HPLC – Systeme 1–1 bzw. 2–2 bestimmt.

5.3.6 Optimierung des Waschmediums für Realproben

Benötigte Lösungen:

1000 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer DON – freien Weizenprobe wurden mit 2 ml eines 1000 ng / ml DON – Standards und 38 ml H₂O_{bd} versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicatifritte (Porosität 5) in eine Saugflasche filtriert. 5 ml des Filtrats wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 ml PBS oder H₂O_{bd} gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 40 % ACN eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 0,5 ml / min. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.3.7 Optimierung des Waschvolumens für Realproben

Benötigte Lösungen:

1000 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer DON – freien Weizenprobe wurden mit 2 ml einer 1000 ng / ml DON – Standardlösung und 38 ml H₂O_{bd} versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicatifritte (Porosität 5) in eine Saugflasche filtriert. 5 ml des Filtrats wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 bzw. 15 ml H₂O_{bd} gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 40 % ACN eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 0,5 ml / min. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.3.8 Anwendbarkeit von Detergentien – Standardversuch

Benötigte Lösungen:

100 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

ROTI – BLOCK : H₂O, 5:95 (v:v)

TRITON X – 100 : H₂O, 1:99 (v:v)

TWEEN 20 : H₂O, 1:99 (v:v)

MeOH : H₂O, 1:99 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Es wurden 5 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung auf die Säule aufgegeben, mit 15 ml der jeweiligen Waschlösung gewaschen und DON mit 4 ml 40 % ACN eluiert.

Mit ROTI – BLOCK wurde noch ein weiterer Versuch durchgeführt: es wurden 5 ml einer 100 ng / ml DON – Standardlösung auf die Säule aufgegeben, diese wurde mit 15 ml 5 % ROTI – BLOCK Lösung gewaschen und danach mit 5 ml H₂O_{bd} nachgewaschen. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN eluiert und anschließend ACN im Stickstoffstrom entfernt. Das Endvolumen wurde mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.3.9 Anwendbarkeit von Detergentien – Test mit Matrix

Benötigte Lösungen:

1000 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

PBS

ROTI – BLOCK : H₂O, 5:95 (v:v)

TRITON X – 100 : H₂O, 0,1:99,9 (v:v)

TWEEN 20 : H₂O, 0,1:99,9 (v:v)

MeOH : H₂O, 1:99 (v:v)

Eine Mais – und eine Weizenprobe wurden mit einer 1000 ng / ml DON – Standardlösung mit 400 µg / kg gespiket, und DON wurde, wie in Kap. 5.3.2 beschrieben, aus den Proben extrahiert. Währenddessen wurde eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). Der Extrakt wurde auf die Säulen aufgegeben. Die Säulen, die mit Maisextrakt beladen worden waren, wurden anschließend mit 10 ml der im Standardversuch getesteten Waschlösungen gewaschen, wobei TRITON und TWEEN 20 in einer um einen Faktor 10 geringeren Konzentration eingesetzt wurden. Die Waschlösungen wurden dabei so schnell wie möglich mittels einer Spritze durch

die Säule gedrückt. Anschließend wurden die Säulen noch mit 5 ml Wasser nachgewaschen. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN eluiert, danach ACN im Stickstoffstrom entfernt. Das Endvolumen wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 5 ml eingestellt.

Säulen, die mit Weizenextrakt beladen wurden, wurden mit 10 ml 1 % MeOH gewaschen und mit 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ nachgewaschen. DON wurde mit 4 ml 40 % ACN eluiert und anschließend ACN im Stickstoffstrom entfernt. Das Endvolumen wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.3.10 Optimierte Methoden zur Bestimmung von DON und ZON in Realproben

5.3.10.1 DON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$

ACN : H_2O , 40:60 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer Probe wurden eingewogen und mit 40 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicafritte (Porosität 5) in eine Saugflasche filtriert. 5 ml des Filtrats wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 15 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 40 % ACN eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 0,5 ml / min. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 1–1 bestimmt.

5.3.10.2 ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

PBS

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer gemahlenden Probe wurden eingewogen und mit 20 ml 60 % ACN versetzt. Die Probensuspension wurde 1h unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Der Extrakt wurde danach durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 32 ml verdünnt und die gesamte Lösung auf die Immunaффinitätssäule aufgegeben. Die Säule wurde mit 10 ml 10 % MeOH gewaschen und ZON anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert. Das Eluat wurde auf ein Endvolumen von 5 ml mit H₂O_{bd} eingestellt. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 2–2 bestimmt.

5.3.10.3 DON/ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

PBS

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer Probe wurden eingewogen und mit 20 ml 60 % ACN versetzt. Die Probensuspension wurde 1 h unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Danach wurde der Überstand durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 32 ml aufgefüllt (ACN Konz. ~ 10 %) und die gesamte Lösung auf die Säule

aufgegeben. Die Säule wurde mit 10 ml 10 % MeOH gewaschen und die Mykotoxine anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON – bzw. ZON – Konzentrationen im Eluat wurden mittels der HPLC – Systeme 1–1 bzw. 2–2 bestimmt. Betrug die gefundene DON – Konzentration ≥ 600 ng / ml oder die ZON – Konzentration ≥ 2900 ng / ml, war es wahrscheinlich, dass die Bindungskapazität der Immunaффinitätssäule überschritten worden war. In diesem Fall wurde die Aufarbeitung der Probe wiederholt, aber nur 1 ml des Filtrats mit 10 ml PBS versetzt, und diese Lösung auf die DON/ZON – Immunaффinitätssäule aufgegeben.

5.3.11 Standardaddition

5.3.11.1 DON – Immunaффinitätssäule

Benötigte Lösungen:

1000 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer Probe wurden mit 0, 2, 4 bzw. 6 ml einer 1000 ng / ml DON – Standardlösung und mit 40, 38, 36 bzw. 34 ml H₂O_{bd} versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine trockene Borsilicafritte (Porosität 5) in eine trockene Saugflasche filtriert. 5 ml des Filtrats wurden auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 15 ml H₂O_{bd} gewaschen und DON anschließend mit 4 ml 40 % ACN eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug während des ganzen Prozesses 0,5 ml / min. Acetonitril wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die DON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC – Systems

1–1 bestimmt. Um die Wiederfindungen genau ermitteln zu können, wurde auch die auf die Immunaффinitätssäule aufgegebene Standardlösung injiziert.

5.3.11.2 Standardaddition für ZON

Benötigte Lösungen:

10,44 µg / ml ZON – Stammlösung in ACN

H₂O_{bd}

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

PBS

Eine Immunaффinitätssäule, in der 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer Probe wurden eingewogen, mit einer 10,44 µg / ml ZON – Stammlösung gemäß der folgenden Tabelle gespiket, und mit 20 ml 60 % ACN versetzt.

Tabelle 45: Spikeschema für die Standardaddition von ZON.

Spikelevel	ZON [µg / kg]	Volumen der ZON – Stammlösung [µl]
0	0	0
1	50	23,9
2	75	35,9
3	100	47,9

Die Probensuspension wurde eine Stunde unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Danach wurde die Suspension durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 32 ml aufgefüllt und die gesamte Lösung auf die Immunaффinitätssäule aufgegeben. Die Säule wurde mit 10 ml 10 % MeOH gewaschen, ZON anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Die ZON – Konzentration im Eluat wurde mittels des HPLC Systems 2–2 bestimmt.

5.3.11.3 DON/ZON – Immunaффinitätssäulen

Benötigte Lösungen:

104,4 µg / ml DON – Stammlösung in ACN

10,44 µg / ml ZON – Stammlösung in ACN

H₂O_{bd}

PBS

MeOH : H₂O, 10:90 (v:v)

ACN : H₂O, 50:50 (v:v)

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

Eine Immunaффinitätssäule, in der 2 mg DON – AK und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 immobilisiert waren, wurde für die Verwendung vorbereitet (siehe Kap. 5.2.4). 5 g einer Probe wurden eingewogen, mit einer 104,4 µg / ml DON und einer 10,44 µg / ml ZON – Stammlösung gemäß der Tabelle 46 gespiket, und mit 20 ml 60 % ACN versetzt. Die Probensuspension wurde eine Stunde unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Danach wurde durch ein Blaubandfilter filtriert. 5 ml des Filtrats wurden mit PBS auf 32 ml aufgefüllt und die gesamte Lösung auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 10 ml 10 % MeOH gewaschen und ZON anschließend mit 4 ml 50 % ACN eluiert, ACN im Stickstoffstrom entfernt und das Endvolumen mit H₂O_{bd} auf 5 ml eingestellt. Anschließend wurden die DON – bzw. ZON – Konzentrationen im Eluat mittels der HPLC – Systeme 1–1 und 2–2 bestimmt. Um die Wiederfindungen genau ermitteln zu können, wurde der höchste Spikelevel simuliert und ebenfalls in die HPLC injiziert.

Tabelle 46: Spikeschema für die Standardaddition von DON und ZON.

Spikelevel	DON [µg / kg]	Volumen der DON – Stammlösung [µl]	ZON [µg / kg]	Volumen der ZON – Stammlösung [µl]
0	0	0	0	0
1	200	9,6	50	23,9
2	400	19,2	75	35,9
3	600	28,7	100	47,9

5.3.12 **Aufarbeitung der Realproben mit einer DONPREP – Säule**

Benötigte Lösungen:

1000 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

MeOH

5 g einer Probe wurden mit 2 ml einer 1000 ng / ml DON – Standardlösung und 38 ml H₂O_{bd} versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicafritte (Porosität 5) in eine Saugflasche filtriert.

Währenddessen wurde die obere Abdeckung der DONPREP Säule abgenommen und die Säule auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde auch die untere Abdeckung entfernt, 2 ml des Probenfiltrats auf die Säule aufgebracht und drucklos durch die Säule fließen gelassen. Die Säule wurde mit 5 ml H₂O_{bd} gewaschen und die Waschlösung aus der Säule mit einer Spritzenpumpe entfernt. DON wurde mit 1,5 ml MeOH von der Säule unter Rückspülen eluiert, d.h. wenn 2 – 3 Tropfen Methanol die Säule passiert haben, wurde die restliche MeOH Lösung mit der Spritzenpumpe wieder hochgezogen, sodass sie im AK – Bereich der Säule verblieb. Sobald die nächsten 2–3 Tropfen die Säule passiert hatten, wurde der Vorgang wiederholt. Diese Prozedur wurde mindestens dreimal wiederholt. Schließlich wurden auch die letzten MeOH Tropfen aus der Säule mit der Spritzenpumpe verdrängt. MeOH wurde aus dem Eluat im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 ml H₂O_{bd} aufgenommen. Die DON – Konzentration wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt. Um die Wiederfindung genau ermitteln zu können, wurde auch die auf die Immunaффinitätssäule aufgegebene Standardlösung injiziert.

5.3.13 Wiederverwendbarkeit der DONPREP – Säule

Benötigte Lösungen:

1000 ng / ml DON – Standardlösung in PBS

H₂O_{bd}

ACN : H₂O, 40:60 (v:v)

5 g einer Probe wurden mit 2 ml einer 1000 ng / ml DON – Standardlösung und 38 ml H₂O_{bd} versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden etwa 20 ml der Suspension 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch eine Borsilicatifritte (Porosität 5) in eine Saugflasche filtriert. Währenddessen wurde die obere Abdeckung der DONPREP Säule abgenommen und die Säule auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde auch die untere Abdeckung entfernt und die Säule mit 20 ml PBS gewaschen. 1 ml des Probenfiltrats wurde auf die Säule aufgebracht und drucklos durch die Säule fließen gelassen. Die Säule wurde mit 2 ml H₂O_{bd} gewaschen.

DON wurde mit 1,5 ml 40 % ACN von der Säule eluiert. Acetonitril wurde aus dem Eluat im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 ml H₂O_{bd} aufgenommen. Die DON – Konzentration wurde mittels des HPLC – Systems 1–1 bestimmt. Um die Wiederfindung genau ermitteln zu können, wurde auch die auf die Immunaффinitätssäule aufgegebene Standardlösung injiziert. Die Säule wurde mit 20 ml PBS regeneriert und verschlossen bei 4 °C aufbewahrt. Vor der nächsten Verwendung wurde die Säule auf Raumtemperatur gebracht und mit 20 ml PBS äquilibriert.

5.3.14 **Aufarbeitung der Realproben mit ZEARASTAR – Säulen**

Die Aufarbeitung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

ACN : H₂O, 60:40 (v:v)

H₂O_{bd}

MeOH

25 g einer zerkleinerten Probe wurden in einen 250 ml Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach der Zugabe von 100 ml Extraktionslösung ACN : H₂O, 60:40 (v:v) wurde das Gefäß luftdicht verschlossen. Die Probe wurde danach 1 Stunde am Schüttler extrahiert und Extrakt anschließend über einen Faltenfilter filtriert. 4 ml des klaren Filtrates (entspricht 1 g Probe) wurden mit 48 ml PBS versetzt.

Die ZEARASTAR – Immunaффinitätssäule wurde auf einen verschlossenen Luer – Absperrhahn aufgesetzt und auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde das verdünnte Filtrat auf die Säule aufgegeben. Beim Waschen der Säule wurde auch das Vorratsgefäß ausgespült. Die ZEARASTAR Säule wurde mit 2 x 10 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die in der Säule verbliebenen Flüssigkeitsreste wurden entfernt. Danach wurde ZON mit 1,5 ml Methanol in mehreren kleineren Fraktionen eluiert. Die Methanolreste wurden aus der Säule gedrückt und mit dem Eluat vereinigt. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingengt und mit 1 ml H₂O_{bd} aufgefüllt.

6 Chemikalienverzeichnis

15 – Acetyl – DON, Biopure

3 – Acetyl – DON, Biopure

Acetonitril, Fisher Scientific

Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Fisher Scientific

Deepoxy – DON, Biopure

Deoxynivalenol in ACN (100,8 µg / ml), Biopure

Deoxynivalenol, Biopure

Deoxynivalenol, Sigma

Dinatriumhydrogenphosphat – Dodekahydrat, Fluka

Essigsäure, puriss. p.a., Fluka

Ethanol absolut, p.a., Riedel – de Haën

Methanol, Fisher Scientific

Monoklonale DON – Antikörper, Zheng Zhong Ming

Monoklonale ZON – Antikörper, Klon 1, Zheng Zhong Ming

Monoklonale ZON – Antikörper, Klon 2, Zheng Zhong Ming

Natriumacetat – Trihydrat, Sigma

Natriumchlorid, 99,5 %, Sigma

Natriumdihydrogenphosphat – Monohydrat, Merck

Natriumdihydrogenphosphat – Monohydrat, Sigma

Natriumhydrogenphosphat, 99 %, wasserfrei, Sigma

Natriumhydroxid Plätzchen, p.a., Merck

Rabbit IgG Reagent grade, Sigma

Roti – Block, Karl Roth

Salzsäure, rauchend, 37 %, p.a., Merck

Stickstoff verdichtet, Standardqualität (technisch), Air Liquide Austria GmbH

Tetramethylorthosilicat, Fluka

Triton X – 100, Sigma

Tween 20, Sigma

Zearalanon, Sigma

Zearalenon, Biopure

Zearalenon, Sigma

α – Zearalanol, Sigma

α – Zearalenol, Sigma

β – Zearalanol, Sigma

β – Zearalenol, Sigma

7 Geräte – und Materialverzeichnis

Laborutensilien:

Diverse Gefäße:	Bechergläser Eppendorfgefäße Erlenmeyerkolben Falconröhrchen, Bibby Sterilin Messkolben Messzylinder Saugflasche Szintillationsfläschchen, Bibby Sterilin
Andere Gegenstände:	Löffel Pasteurpipetten Spateln Trichter Wägeschälchen
Immunaффinitätssäulen	DONPREP, R–Biopharm ZEARASTAR, Romer Labs
Festphasenextraktion:	Isolute [®] C18–Säulen, 3 ml, 500 mg, IST
Filtrationszubehör:	Borsilicatifritte, Porosität 5 (= 1–1,6 µm) Fritten (für 3 ml Säulen) LiChrolut [®] , Merck, Porengröße 10 µm Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra – 4, 30 000 MWCO, Millipore
Glassäule:	3 ml Glassäule LiChrolut [®] , Merck

Allgemeine Laborausrüstung:

Accelerated solvent Extractor:	ASE 100, Dionex
Analysenwaage:	TE 214S, Sartorius
Festphasenextraktionsapparatur:	Millipore, Sep – Pak, Waters Vacuum Manifold
Magnetrührgerät:	Tokyo Kagakusangyo, Co, LTD, MS – 16 B
pH – Meter:	Metrohm 691
Pipetten:	Gilson 20 – 200 µl Eppendorf 100 – 1000 µl Eppendorf 1000 – 5000 µl
Rotavapor:	Büchi R – 114, mit Wasserbad Büchi B – 480
Trockenschrank:	Memmert, Model 500
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex Super RK103H
Vakuumpumpe:	Millipore, XX5522050
Vortex:	Janke & Kunkel, IKA – Labortechnik, VF2
Zentrifuge:	Sigma 4K10, 5500 rpm, Einsätze für 15 ml Zentrifugenröhrchen
Kugelmühle:	MM 2000, Retsch
Probenschüttler:	IKA – Schüttler MTS 4, Jane & Kunkel IKA – Labortechnik

HLPC:

Pumpen:	Merck – Hitachi, LaChrom L – 7 100 Merck – Hitachi, L – 6200 Intelligent Pump
Injektorblock:	Rheodyne
Säulen:	Phenomenex, Synergi 4u Polar – RP, Partikeldurchmesser 4 µm, Porengröße 80 Å, Innendurchmesser 4,6 mm, Länge 25 cm ACE–111–1502, Packungsmaterial Silica – C – 18, Partikeldurchmesser 3 µm, Porengröße 100 Å, Innendurchmesser 3 mm, Länge 15 cm

Säulenöfen:	W.O.Electronics column thermostat BFO – 04
	Merck – Hitachi column oven 655 A–52
Detektoren:	Fluoreszenz: Merck – Hitachi, F – 1080, Fluorescence Detector UV: Merck – Hitachi, L – 4000 UV Detector
Auswerteprogramme:	DOS, HP 19471A Software McDacq for Windows Version 1.3x Stratos V 3.0

8 Zusammenfassung

Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sind zwei weltweit verbreitete und häufig auftretende Mykotoxine. Aufgrund ihrer toxischen Wirkung wurden in vielen Ländern Grenzwerte für ihr Vorkommen in Lebens – und Futtermitteln gesetzt. Selektive und empfindliche Analysenmethoden sind erforderlich, um die Einhaltung der gesetzlichen Regelungen kontrollieren zu können. Zur Probenvorbereitung werden häufig kommerziell erhältliche Immunaффinitätssäulchen, in denen die Antikörper kovalent an einem festen Trägermaterial gebunden sind, eingesetzt. Diese Säulchen haben jedoch den Nachteil, dass sie teuer sind und nicht wiederverwendet werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollten neue Probenvorbereitungsmethoden, basierend auf dem Einsatz von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen, zur Isolierung von DON, zur Isolierung von ZON und zur gleichzeitigen Isolierung von DON und ZON entwickelt werden. Dazu wurden entweder monoklonale DON – Antikörper, monoklonale ZON – Antikörper oder gleichzeitig DON – und ZON – Antikörper mittels der Sol – Gel Methode immobilisiert. Zur Bestimmung der Konzentration von DON wurde eine HPLC – Methode mit UV Detektion, zur Bestimmung der Konzentration von ZON eine HPLC – Methode mit Fluoreszenzdetektion angewendet.

DON – Immunaффinitätssäulen, die 1 mg DON – Antikörper enthielten, hatten eine Durchbruchskapazität von 1000 ng DON. Optimierungsversuche zeigten, dass bereits eine geringe Konzentration an Acetonitril (ACN) in der Aufgabelösung zu einem Durchbruch von DON führte und daher nur PBS als Aufgabemedium geeignet war. Mit ACN – Wasser, 40 : 60 (v / v) konnte DON vollständig und in einem kleinen Elutionsvolumen eluiert werden, ohne eine irreversible Denaturierung der Antikörper hervorzurufen. In einem Konzentrationsbereich von 25 bis 100 ng DON / ml und bei einem Aufgabevolumen von 3 bis 12 ml wurde die Wiederfindung von DON weder von der DON – Konzentration noch von dem Aufgabevolumen beeinflusst. Versuche mit Realproben zeigten, dass eine hohe Wiederfindung von DON nur mit einer Aufgabegeschwindigkeit $\leq 0,5$ ml / min erzielt werden konnte. Mit den DON – Immunaффinitätssäulen konnten Matrixkomponenten effizient entfernt werden. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Bindungskapazität der Säulen in Anwesenheit

von Matrix annähernd halbiert war. Durch die Analyse einer zertifizierten Referenzprobe wurde die Richtigkeit der entwickelten Methode bestätigt.

Zur Herstellung von ZON – Immunaффinitätssäulen standen zwei Klone von monoklonalen Antikörpern zur Verfügung. 1 µg Antikörper des Klons 1 konnte 4 ng ZON binden, 1 µg Antikörper des Klons 2 3,5 ng ZON. Im Unterschied zu DON hatte eine ACN – Konzentration von 10 % in der Aufgabelösung keinen Einfluss auf die Wiederfindung. Der mit dem Antikörper des Klons 2 gebildete Antigen – Antikörper Komplex war leichter zu dissoziieren als der mit dem Antikörper des Klons 1 gebildete Komplex. Im Fall der Antikörper des Klons 1 wurde ZON erst ab einer ACN – Konzentration von 60 % vollständig eluiert, im Fall der Antikörper des Klons 2 bereits ab einer ACN – Konzentration von 50 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Versuche mit den Antikörpern des Klons 2 durchgeführt. ZON – Immunaффinitätssäulen konnten mindestens 8mal verwendet werden, ohne dass eine Abnahme der Wiederfindung von ZON beobachtet wurde. Die mittlere Wiederfindung von ZON lag bei 90 %, die Standardabweichung bei 4 %. Chromatogramme von aufgearbeiteten Extrakten von Weizenproben wiesen keine störenden Matrixpeaks auf. Bei der Aufarbeitung einer Weizenmehlprobe betrug die Wiederfindung von ZON 98 ± 3 %.

Bei der Entwicklung der Methode zur gleichzeitigen Isolierung von DON und ZON musste die unterschiedliche Toleranz der DON – und ZON – Antikörper gegenüber organischen Lösungsmitteln berücksichtigt werden. Die Schwierigkeit lag darin, ein Aufgabemedium zu finden, welches die Retention beider Mykotoxine ermöglichte, sowie ein Elutionsmittel, mit dem beide Antigen-Antikörper Komplexe dissoziiert wurden. In der mit Standardlösungen optimierten Methode wurden DON und ZON mit ACN – Wasser, 60:40 (v / v) co – extrahiert, danach die ACN – Konzentration durch Verdünnen auf 2,5 % reduziert und der verdünnte Extrakt auf die DON/ZON – Immunaффinitätssäule aufgegeben. Die Säulen wurden mit 5 ml MeOH – Wasser, 10 : 90 (v / v) gewaschen bevor DON und ZON mit 4 ml ACN – Wasser, 50 : 50, (v / v) co – eluiert wurden. Um die DON/ZON Säulchen zur Aufarbeitung von Realproben anwenden zu können, war jedoch eine weitere Optimierung der Operationsbedingungen erforderlich. Die Selektivität der Säulchen war vergleichbar mit der von kommerziellen DON – bzw. ZON – Immunaффinitätssäulchen, im Unterschied zu diesen konnten sie jedoch zur Aufarbeitung von mehreren Proben eingesetzt werden.

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

15 – A – DON	15 – Acetyl – DON
3 – A – DON	3 – Acetyl – DON
ACN	Acetonitril
AG	Antigen
AG – AK	Antigen – Antikörper – Komplex
AK	Antikörper
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ASE	Accelerated Solvent Extraktion
BPA	Bisphenol A
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DOM	Deepoxy – DON
DON	Deoxynivalenol
ECD	Elektrochemischer Detektor
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IAS	Immunaффinitätssäule
IFE	Immunfiltrationseinheit

Ig	Immunglobulin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Flüssigkeitschromatographie
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50 % der Population stirbt
LOD	Limit of Detection
LOEL	Low Observed Effect Level
MeOH	Methanol
Mr	Relative Molmasse [g / mol]
MS	Massenspektrometrie
NOEL	No Observed Effect Level
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethen, Polyethylen
PTFE	Polytetrafluorethen, Polytetrafluorethylen, Teflon
RT	Raumtemperatur
SPE	Solid Phase Extraction
TDI	Tolerable Daily Intake
TMOS	Tetramethoxysilan
UV	Ultraviolett
ZAN	Zearalanon
ZON	Zearalenon
α – ZAL	α – Zearalanol
α – ZOL	α – Zearalenol
β – ZAL	β – Zearalanol
β – ZOL	β – Zearalenol

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von B – Trichothecen.	7
Abbildung 2: Chemische Struktur von Zearalenon.	10
Abbildung 3: Schema der Herstellung von Sol – Gel – Immunaффinitätssäulen.	24
Abbildung 4: Beispiel eines Chromatogramms.	36
Abbildung 5: Chromatographischer Peak und Peakbreiten.	38
Abbildung 6: Kurvenverlauf der van – Deemter Funktion und Beiträge der Eddy – Diffusion, der Longitudinaldiffusion und des Massentransportterms. ...	40
Abbildung 7: Injektor.	45
Abbildung 8: Jablonski Termschema.	49
Abbildung 9: Electrospray – Interface.	52
Abbildung 10: Aufbau einer Ionenfalle.	53
Abbildung 11: Chromatogramm einer DON – Standardlösung, Konzentration 1000 ng / ml in PBS, (HPLC – System 1–1).	56
Abbildung 12: Beispiel einer Kalibrierfunktion für DON (HPLC – System 1–1).	56
Abbildung 13: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung, Konzentration 50 ng / ml in Wasser (HPLC – System 2–1).	57
Abbildung 14: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung, Konzentration 100 ng / ml in Wasser (HPLC – System 2–2).	58
Abbildung 15: Beispiel einer Kalibrierfunktion für ZON (HPLC – System 2–1).	58
Abbildung 16: Beispiel einer Kalibrierfunktion für ZON (HPLC – System 2–2).	59
Abbildung 17: EIC ($m/z = 295$) einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H ₂ O..	60
Abbildung 18: EIC ($m/z = 317$) einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H ₂ O..	60
Abbildung 19: MS2 ($m/z = 295$) Spektrum einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H ₂ O.	60
Abbildung 20: MS2 ($m/z = 317$) Spektrum einer DON und ZON hältigen Standardlösung: DON Konzentration: 1000 ng / ml, ZON Konzentration: 500 ng / ml in H ₂ O.	61
Abbildung 21: Kalibrierfunktion für DON (LC / MS – System).	61
Abbildung 22: Kalibrierfunktion für ZON (LC / MS – System).	62

Abbildung 23: Durchbruchskurve von DON. Säule: 0,5 mg DON – AK, Konzentration der Standardlösung: 100 ng / ml, Fraktionsvolumen: 1 ml.	63
Abbildung 24: Konzentration von DON in den Aufgabe–, Wasch–, und Elutionsfraktionen. Fraktionsvolumen: 1 ml.	64
Abbildung 25: Chromatogramm einer Standardlösung, die DON, DOM, 15 – A – DON und 3 – A – DON enthielt. Die Konzentration der Verbindungen betrug jeweils 300 ng / ml (HPLC – System 1–1).	66
Abbildung 26: DON – Durchbruchskurven in Abhängigkeit vom Aufgabemedium. Säule: 0,5 mg DON – AK, Konzentration der Standardlösung: 100 ng / ml, Fraktionsvolumen: 1 ml.	68
Abbildung 27: Die in den einzelnen Eluatfraktionen gefundene DON – Menge in Abhängigkeit von der ACN – Konzentration des Elutionsmittels. Säule: 1 mg DON – AK, Fraktionsvolumen: 0,5 ml.	70
Abbildung 28: Chromatogramm eines Weizenmehlextrakts vor der IAS, (HPLC – System 1–1).	75
Abbildung 29: Chromatogramm eines Maismehlextrakts vor der IAS, (HPLC – System 1–1).	75
Abbildung 30: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer gespiketen Weizenmehlprobe, Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe, (HPLC – System 1–1).	76
Abbildung 31: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer gespiketen Maismehlprobe, Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe, (HPLC – System 1–1).	76
Abbildung 32: Chromatogramm eines mit einer DONPREP – Säule aufgearbeiteten Extrakts einer Weizenmehlprobe, Spikelevel 800 µg / kg, (HPLC – System 1–1).	76
Abbildung 33: Chromatogramm einer 5 % igen Roti – Block – Lösung, (HPLC – System 1–1).	77
Abbildung 34: Chromatogramm einer 1 % igen Triton X–100 – Lösung, (HPLC – System 1–1).	77
Abbildung 35: Chromatogramm einer 1 % igen Tween 20 – Lösung, (HPLC – System 1–1).	78
Abbildung 36: Chromatogramm einer 1 % igen MeOH – Lösung, (HPLC – System 1–1).	78

Abbildung 37: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe), IAC: Waschlösung 5 ml 1 % iges MeOH, 5 ml Wasser, (HPLC – System 1–1).	80
Abbildung 38: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe), IAC: Waschlösung 10 ml 1 % iges MeOH, 20 ml Wasser, (HPLC – System 1–1).	80
Abbildung 39: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).	82
Abbildung 40: DON – Kalibrierfunktion und Regressionsgerade der Standardaddition für Weizenmehl.	82
Abbildung 41: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Maisprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).	83
Abbildung 42. Kalibrierfunktion und Regressionsgerade der Standardaddition für eine Maisprobe.	84
Abbildung 43: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Spaghettiprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).	85
Abbildung 44: Kalibrierfunktion und Regressionsgerade der Standardaddition für eine Spaghettiprobe.	85
Abbildung 45: Wiederfindung von DON – IAS in Abhängigkeit von der Anzahl der aufgegebenen Proben.	87
Abbildung 46: Stabilität der DON – IAS in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 4 °C in PBS.	88
Abbildung 47: Stabilität der DON – IAS in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei Raumtemperatur in PBS.	88
Abbildung 48: Chromatogramm eines mit der DONPREP aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe	90
Abbildung 49: Chromatogramm eines mit der DONPREP aufgereinigten Extrakts einer Maisprobe	90

Abbildung 50: Chromatogramm eines mit der DONPREP aufgereinigten Extrakts einer Spaghettiprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).	91
Abbildung 51: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenprobe	91
Abbildung 52: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Maisprobe	91
Abbildung 53: Chromatogramm eines mit der DON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Spaghettiprobe (Spikelevel: 800 µg DON / kg Probe), (HPLC – System 1–1).	92
Abbildung 54: EIC (m / z = 295) einer DON – Standardlösung, 2 µg / ml in H ₂ O. Die Retentionszeit von DON betrug 9,2 min.	95
Abbildung 55: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,0 – 9,2 min) nach Injektion einer DON – Standardlösung, 2 µg / ml in H ₂ O.	95
Abbildung 56: EIC (m / z = 295) eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Weizenprobe.	96
Abbildung 57: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 8,5 – 9,0 min) nach Injektion eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Weizenprobe.	96
Abbildung 58: EIC (m / z = 295) eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Spaghettiprobe.	96
Abbildung 59: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,2 – 9,6 min) nach Injektion eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer unkontaminierten Spaghettiprobe.	97
Abbildung 60: EIC (m / z = 295) eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich DON – kontaminierten Maisprobe.	97
Abbildung 61: MS – und MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 8,7 – 8,8 min) nach Injektion eines mit der DON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich DON – kontaminierten Maisprobe.	97
Abbildung 62: Verhalten von ZON in einer mit leerem Sol – Gel – Glas gepackten Glassäule, Fraktionsvolumen 1 ml.	99
Abbildung 63: Verhalten von ZON in einer mit leerem Sol – Gel – Glas gepackten DONPREP Säule, Fraktionsvolumen 1 ml.	99

Abbildung 64: Verhalten von ZON in einer mit leerem Sol – Gel – Glas gepackten Kunststoffsäule, Fraktionsvolumen 1 ml.	100
Abbildung 65: Durchbruchskurve von ZON für eine Säule, die 0,5 g Sol – Gel – Glas und 1 mg unspezifische Antikörper aus Kaninchen enthielt.	102
Abbildung 66: Durchbruchskurve von ZON für eine Säule, die 0,5 g Sol – Gel – Glas und 4,2 mg ZON – AK des Klons 2 enthielt.	103
Abbildung 67: Durchbruchskurve von ZON für eine Säule, die 0,5 g Sol – Gel – Glas und 0,8 mg ZON – AK des Klons 1 enthielt.	104
Abbildung 68: Durchbruchskurven von ZON in Säulen mit 1,7 mg ZON – AK in 0,5 g Sol – Gel – Glas, Fraktionsvolumen 1 ml, ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in Wasser.	105
Abbildung 69: Chromatogramm einer Standardlösung, die ZON und die ZON – Metabolite enthielt; Konzentration der Substanzen siehe Tabelle 19. (HPLC – System 2–2).	106
Abbildung 70: Ermittelte Peakflächen für die gesammelten Eluatfraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsmittel. Säulen mit 4,2 mg Antikörper des Klons 1, aufgegebene Standardlösung: 100 ng / ml ZON in H ₂ O _{bd}	108
Abbildung 71: Ermittelte Peakflächen für die gesammelten Eluatfraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsmittel. Säulen mit 4,2 mg Antikörper des Klons 2, aufgegebene Standardlösung: 100 ng / ml ZON in H ₂ O _{bd}	108
Abbildung 72: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 5, (HPLC – System 2–2).	112
Abbildung 73: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 6, (HPLC – System 2–2).	112
Abbildung 74: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 7, (HPLC – System 2–2).	112
Abbildung 75: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung: 100 ng / ml in PBS, pH = 8, (HPLC – System 2–2).	112
Abbildung 76: Einfluss der MeOH – Konzentration in der Waschlösung auf die Wiederfindung von ZON. ZON – IAS mit 2,5 mg Antikörper des Klons 2.	114
Abbildung 77: Wiederfindung von ZON in Abhängigkeit vom Aufgabevolumen. ZON – IAS mit 2,5 mg Antikörper des Klons 2.	115

Abbildung 78: Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von ZON.....	116
Abbildung 79: Chromatogramm einer ZON – Standardlösung, Konzentration 50 ng / ml in Wasser, (HPLC – System 2–1).	121
Abbildung 80: Chromatogramm des aufgearbeiteten Extrakts einer gespiketen Maisprobe (Spikelevel 500 µg / kg), aufgearbeitet mit einer ZON – Immunaффinitätssäule (HPLC – System 2–1).	121
Abbildung 81: Chromatogramm des Eluats einer gespiketen Maisprobe, (Spikelevel 500 µg / kg), aufgearbeitet mit einer SPE Säule, (HPLC – System 2–1).	122
Abbildung 82: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, mit 60 % ACN am Schüttler extrahiert (HPLC – System 2–2).	124
Abbildung 83: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, mittels ASE mit ACN : MeOH, 50 : 50 in zwei Extraktionszyklen extrahiert (HPLC – System 2–2).	124
Abbildung 84: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, mittels ASE mit ACN : MeOH, 50 : 50 in drei Extraktionszyklen extrahiert (HPLC – System 2–2).	125
Abbildung 85: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe, ungespiket, (HPLC – System 2–2).	128
Abbildung 86: Chromatogramm eines mit der ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel: 100 µg ZON / kg Probe), (HPLC – System 2–2).	128
Abbildung 87: ZON – Standardaddition für eine Weizenprobe.	128
Abbildung 88: EIC (m / z = 317) einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H ₂ O. Die Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.	129
Abbildung 89: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H ₂ O.	129
Abbildung 90: EIC (m / z = 317) eines mit einer ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe, die Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.	130

Abbildung 91: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion eines mit einer ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich ZON – kontaminierten Weizenschrotprobe.....	130
Abbildung 92: Einfluss der ACN – Konzentration im Elutionsmittel auf die DON – Konzentration in den Eluat – Fraktionen. Fraktionsvolumen: 1 ml.....	132
Abbildung 93: Einfluss der ACN – Konzentration im Elutionsmittel auf die ZON – Konzentration in den Eluat – Fraktionen. Fraktionsvolumen: 1 ml.....	133
Abbildung 94: Regressionsgerade der Standardadditionsmethode für DON.....	136
Abbildung 95: Regressionsgerade der Standardadditionsmethode für ZON.	137
Abbildung 96: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).....	139
Abbildung 97: Chromatogramm eines mit der DONPREP – Säule aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).....	139
Abbildung 98: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).....	140
Abbildung 99: Chromatogramm eines mit der ZEARASTAR – Säule aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, extrahiert mit 60 % ACN (Spikelevel: 400 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).....	140
Abbildung 100: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenschrotprobe, natürlich kontaminiert, ungespiket (HPLC – System 1–1).....	142
Abbildung 101: Aufgabe von großen Volumina auf die DON/ZON – IAS.	143
Abbildung 102: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 200 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).....	144
Abbildung 103: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 600 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).....	144
Abbildung 104: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 50 µg ZON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).....	144

Abbildung 105: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 100 µg ZON / kg Probe) (HPLC – System 2–2).....	144
Abbildung 106: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 200 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).....	146
Abbildung 107: Chromatogramm eines mit der DON/ZON – IAS aufgereinigten Extrakts einer Weizenmehlprobe (Spikelevel 600 µg DON / kg Probe) (HPLC – System 1–1).....	146
Abbildung 108: EIC (m / z = 295) eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe, Retentionszeit von DON betrug 9,5 min.	149
Abbildung 109: MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,4 – 9,5 min) nach Injektion eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe.....	149
Abbildung 110: EIC (m / z = 317) eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe, Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.	149
Abbildung 111: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion eines mit einer DON/ZON – IAS aufgearbeiteten Extrakts einer natürlich kontaminierten Weizenschrotprobe.....	150
Abbildung 112: EIC (m / z = 295) einer DON – Standardlösung, 1000 ng / ml in H ₂ O. Die Retentionszeit von DON betrug 9,5 min.	150
Abbildung 113: MS2 Spektrum des DON – Peaks (Retentionszeit 9,5 min) nach Injektion einer DON – Standardlösung, 1000 ng / ml in H ₂ O.	150
Abbildung 114: EIC (m / z = 317) einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H ₂ O. Die Retentionszeit von ZON betrug 11,7 min.	151
Abbildung 115: MS2 Spektrum des ZON – Peaks (Retentionszeit 11,7 min) nach Injektion einer ZON – Standardlösung, 500 ng / ml in H ₂ O.	151

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grenzwerte für DON in Lebens – und Futtermitteln [EU – Verordnung Nr. 856/2005].	13
Tabelle 2: Grenzwerte für ZON in Lebens – und Futtermitteln [EU – Verordnung Nr. 856/2005].	14
Tabelle 3: Aktuelle Studien über die Bestimmung von DON und ZON.	19
Tabelle 4: Einsatz von Sol – Gel immobilisierten Biomolekülen zur Probenvorbereitung.	31
Tabelle 5: Vergleich der Kreuzreaktivitäten in der Säule und im ELISA.	66
Tabelle 6: Einfluss des pH – Wertes der Auftragslösung auf die Wiederfindung von DON.	68
Tabelle 7: Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit auf die Wiederfindung von DON.	71
Tabelle 8: Einfluss der DON – Konzentration und des Aufgabevolumens auf die Wiederfindung von DON.	71
Tabelle 9: Reproduzierbarkeit der Herstellung der DON – IAS.	73
Tabelle 10: Einfluss der Aufgabegeschwindigkeit von Probenextrakten auf die Wiederfindung von DON.	74
Tabelle 11: Einfluss des Waschmediums auf die Wiederfindung von DON.	78
Tabelle 12: Einfluss der Waschlösung auf die Wiederfindung von DON in einer gespiketen Maisprobe (Spikelevel: 400 µg / kg).	79
Tabelle 13: Einfluss der Waschlösung auf die Wiederfindung von DON in einer gespiketen Weizenprobe (Spikelevel: 400 µg / kg).	79
Tabelle 14: Bestimmung der DON – Konzentration in einer zertifizierten Maisprobe.	86
Tabelle 15: Wiederfindung von DON mit 7 Monate alten DON – IAS.	89
Tabelle 16: Wiederverwendbarkeit der DONPREP – Säulen.	93
Tabelle 17: DON – Bindungskapazität bei der Aufgabe eines Maisextrakts.	94
Tabelle 18: Wiederfindung von ZON nach einer zweiwöchigen Lagerung einer ZON – Standardlösung (Konzentration 100 ng / ml in Wasser).	101
Tabelle 19: Zusammensetzung der Lösung, die ZON und ZON – Metabolite enthielt.	106
Tabelle 20: Benötigtes Elutionsvolumen, um eine Wiederfindung von ZON > 90 % zu erreichen.	109

Tabelle 21: Überprüfung der Vollständigkeit der Elution und der Wiederverwendbarkeit der ZON – IAS.....	109
Tabelle 22: Einfluss des Aufgabemediums auf die Wiederfindung von ZON.....	110
Tabelle 23: Einfluss des pH – Werts der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von ZON.	113
Tabelle 24: Batch zu Batch Reproduzierbarkeit.	117
Tabelle 25: Intra– und Interday – Reproduzierbarkeit der Methode.	118
Tabelle 26: Einfluss der Extraktionsmethode auf die gefundene ZON – Konzentration.	126
Tabelle 27: Intra– und Interday Reproduzierbarkeit einer DON/ZON – Immunaффinitätssäule.	134
Tabelle 28: Einfluss der ACN – Konzentration in der Aufgabelösung auf die Wiederfindung von DON und ZON.	138
Tabelle 29: Einfluss der Extraktionslösung auf die gefundene Konzentration von DON und ZON.....	140
Tabelle 30: Gefundene DON – und ZON – Konzentrationen bei reduzierter Aufgabemenge des Extrakts.....	141
Tabelle 31: Ergebnisse der Standardaddition von DON und ZON für eine Weizenprobe.	145
Tabelle 32: Ergebnisse der Standardaddition mit einer DON und ZON – freien Weizenprobe.	147
Tabelle 33: Wiederverwendbarkeit der DON/ZON – Immunaффinitätssäulen.	148
Tabelle 34: Quantifizierung von DON und ZON mittels LC / MS.....	152
Tabelle 35: HPLC – Systeme.	154
Tabelle 36: LC –MS Apparatur.....	155
Tabelle 37: Gradient zur Bestimmung von DON (LC / MS – System).....	156
Tabelle 38: Gradient zur Bestimmung von DON / ZON (LC / MS – System).	156
Tabelle 39: Einstellungen der ESI und der Ionenfalle zur Detektion von DON und ZON.	157
Tabelle 40: Zusammensetzung der Standardlösung, die ZON und ZON – Metabolite enthielt.....	159
Tabelle 41: Herstellung der IAS.	162
Tabelle 42: Aufgabevolumen in Anhängigkeit von der DON – Konzentration.....	167
Tabelle 43: Aufgabevolumen in Abhängigkeit von der ZON – Konzentration.	168

Tabelle 44: Verdünnung des Filtrats zur Aufgabe auf die DON/ZON – Immunaффinitätssäule.	183
Tabelle 45: Spikeschema für die Standardaddition von ZON.	190
Tabelle 46: Spikeschema für die Standardaddition von DON und ZON.	191

9.4 Literaturverzeichnis

- Ardrey, B., 2003**, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: an Introduction*, Wiley–VCh, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 98–105.
- Becci P. J., Voss K. A., Hess F. G., Gallo M. A., Parent R. A., Stevens K. R., Taylor J. M., 1982**, J. Appl. Toxicol. 2, 247–254.
- Biselli S., 2006**, J. Verbr. Lebensm. 1, 106 – 114.
- Braunrath R., Cichna M., 2005**, J. Chromatogr. A, 1062 (2), 189–198.
- Braunrath R., Podlipna D., Padlesak S., Cichna–Markl M., 2005**, J. Agric. Food Chem., 53 (23), 8911–8917.
- Brenn – Struckhofova Z., 2005**, *Immunaффinitätschromatographie und Immunfiltration zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von Bisphenol A in Wein*, Diplomarbeit, Universität Wien.
- Brenn – Struckhofova Z., Cichna – Markl M., 2006**, Food Add. Contam. 23 (11), 1227–1235.
- Brenn – Struckhofova Z., Cichna – Markl M., Böhm C., Razzazi – Fazeli E., 2007**, Anal. Chem., 79 (2), 710–717.
- Bronshtein A., Aharonson N., Turniansky A., Altstein M., 2000**, Chem. Mater., 12 (7), 2050–2058.
- Cammann, K., 2001**, *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 5–11 – 5–18, 5–63 – 5–64, 6–5 – 6–13, 6–27 – 6–32, 6–34 – 6–48.
- Cavaliere C., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Lagana A., 2005**, Rapid Commun. Mass Spectrom., 19, 2085–2093.

- Champeil A., Fourbet J. – F., Doré T., 2004**, J. Agric. Food Chem., 52, 6049 – 6054.
- Cichna – Markl M., 2006**, J. Chromatogr. A, 1124, 167–180.
- Cichna M., Knopp D., Niessner R., 1997 (a)**, Anal. Chim. Acta, 399 (3), 241–250.
- Cichna M., Markl P., Knopp D., Niessner R., 1997 (b)**, Chem. Mater., 9 (11), 2640–2646.
- Cichna M., Markl P., Knopp D., Niessner R., 2001**, J. Chromatogr. A, 919 (1), 51–58.
- Commission Regulation (Ec) No 856/2005, 7.6.2005**, Official Journal of the European Union, L 143/3.
- Dacasto M., Rolando P., Nachtman C., Ceppa L., Nebbia C., 1995**, Vet. Hum. Toxicol., 37, 359–361.
- Dall'Asta C., Sforza S., Galverna G., Dossena A., Marchelli R., 2004**, J. Chromatogr. A, 1054, 389–395.
- Dean P. D. G., Johnson W. S., Middle F. A., 1991**, *Affinity Chromatography. A practical approach*, IRL Press Oxford, Washington DC, 4. Auflage, 1–8, 31–33.
- Degelmann P., Jürling H., Müller J., Niessner R., Knopp D., 2006**, J. Agric. Food Chem., 54 (6), 2003–2011.
- Dickey F. H., 1955**, J. Phys. Chem., 59, 695 – 707.
- Doerffel K., Geyer R., Müller H., 1994**, *Analytikum*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, Stuttgart, 9. Auflage, 414–415, 422, 435–438,
- Doko M. B., Canet C., Brown N., Sydenham E. W., Mpuchane S., Siame B. A., 1996**, J. Agric. Food Chem., 44, 3240–3243.
- Ellerby L. M., Nishida C. R., Nishida F., Yamanaka S. A., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I., 1992**, Science 255, 1113.
- EI – Nezami H., Polychronaki N., Lee Y. K., Haskard C., Juvonene R., Salminen S., Mykkänen H., 2004**, J. Agric. Food Chem., 52, 4577–4581.
- Forsell J. H., Jensen R., Tai J.–H., Witt M., Lin, W. S., Pestka J. J., 1987**, Food Chem. Toxicol., 25, 155–162.
- Gill I., Ballesteros A., 2000**, Tibtech, 18, 282 – 296.
- Hartmann N., Erbs M., Wettstein F. E., Schwarzenbach R. P., Bucheli T. D., 2007**, J. Chromatogr. A, 1138, 132–140.

- Häubl G., Berthiller F., Krska R., Schumacher R., 2006**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 692–696.
- Hidy P. H., Baldwin R. S., Greasham R. L., Keith C. L., McMullan J. R., 1977**, *Adv. Appl. Microbiol.*, 22, 55–82.
- Hodgson R. J., Brook M. A., Brennan J. D., 2005**, *Anal. Chem.*, 77 (14), 4404–4412.
- Hrebicek T., Cichna – Markl M., 2005**, *J. Sol – Gel Sci. Technol.*, 36 (3), 275–283.
- Hughes D. M., Gahl M. J., Graham C. H., Grieb, S. L., 1999**, *J. Anim. Sci.*, 77, 693–700.
- JECFA 44, 2000**, *Zearalenone*, IPCS INCHEM, 1. Auflage, 1, 33.
- JECFA 47, 2001**, *Deoxynivalenol*, IPCS INCHEM, 1. Auflage, 3, 41, 43–44.
- Josephs R. D., Krska R., MacDonald S., Wilson P., Pettersson H., 2003**, *J. AOAC Int.*, 86, 50–60.
- Klötzel M., Lauber U., Humpf H.–U., 2006**, *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 261–269.
- Kotal F., Radova Z., 2002**, *Czech J. Food. Sci.*, 20 (2), 63–68.
- Krska R., Baumgartner S., Josephs R., 2001**, *J. Anal. Chem.*, 371, 285–299.
- Krska R., Josephs R., 2001**, *J. Anal. Chem.*, 369, 469–476.
- Luo Y., Yoshizawa T., Katayama T., 1990**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3723–3726.
- Milanez T. V., Valente – Soares L. M., 2006**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17 (2), 412–416.
- Molto G. A., Gonzalez H. H., Resnik S. L., Pereyra–Gonzalez A., 1997**, *Food Addit. Contam.*, 14, 263–268.
- Morgavi D. P., Riley R. T., 2007**, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 173, 201–212.
- Otto, M., 2000**, *Analytische Chemie*, Wiley–VCh, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2. Auflage, 280–287.
- Pallaroni L., Björklund E., von Holst C., 2002**, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 25 (6), 913–926.
- Pallaroni L., von Holst C., 2003 (a)**, *J. Chromatogr. A*, 993, 39–45.
- Pallaroni L., von Holst C., 2003 (b)**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 908–912.

- Pestka J. J., Lin W. S., Miller, E. R., 1987, Food Chem. Toxicol., 25, 855–858.**
- Podlipna D., Cichna – Markl M., 2007, Eur. Food Res. Technol., 224 (5), 629–634.**
- Prelusky D. B., Rotter B A., Thompson B. K., Trenholm H. L., 1997, J. Environ. Sci Health B, 32 (3), 429–448.**
- Rainey M. R., Tubbs R. C., Bennet L.W., Cox N. M., 1990, J. Anim. Sci., 68, 2015–2022.**
- Razzazi – Fazeli E., Böhm J., Jarukamjorn K., Zentek J., 2003, J. Chromatogr. B, 796, 21–33.**
- Rotter B. A., Prelusky D. B., Pestka J. J., 1996, J. Toxicol. Environ. Health, 48, 1–34.**
- Royer D., Humpf H. U., Guy P. A., 2004, Food Addit. Contam., 21 (7), 678 – 692.**
- Ryu D., Hanna M. A., Eskridge K. M., Bullerman L. B., 2003, J. Agric Food Chem., 51, 1746–1748.**
- Schöringhumer K., Cichna – Markl M., 2007, J. Chromatogr. B, 850 (1–2), 361–369.**
- Schothorst R. C., Jekel A. A., 2003, Food Chem., 82, 475–479.**
- Shepherd M. J., Gilbert J., 1988, J. Agric. Food Chem., 36, 305–308.**
- Spitzer B., Cichna M., Markl P., Sontag G., Knopp D., Niessner R., 2000, J. Chromatogr. A, 880 (1–2), 113–120.**
- Stalikas C., Knopp D., Niessner R., 2002, Environ. Sci. Technol., 36 (15), 3372–3377.**
- Stidl R., Cichna – Markl M., 2007, J. Sol – Gel Sci. Technol, 41 (2), 175–183.**
- Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R., 2006, Rapid Commun. Mass Spectrom., 20, 2649–2659.**
- Tanaka T., Hasegawa A., Yamamoto S., Lee U. S., Sugiura Y., Ueno Y., 1988, J. Agric. Food Chem., 36, 979–983.**
- van Egmond H. P., Schothorst R. C., Jonker M. A., 2007, Anal. Bioanal. Chem., 389, 147–157.**
- Yamashita A., Yoshizawa T., Aiura Y., Sanchez P.C., Dizon E.I., Arim R.H., Sardjono, 1995, Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 1804–1807.**

Yang H.-H., Zhu Q.-Z., Qu H.-Y., Chen X.-L., Ding M.-T., Xu J.-G., 2002, *Anal. Biochem.*, 308 (1), 71–76.

Zhang X., Martens D., Krämer P. M., Kettrup A. A., Liang X., 2006, *J. Chromatogr. A*, 1133 (1–2), 112–118.

Zühlke J., Knopp D., Niessner R., 1995, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352, (7–8), 654–659.

9.5 Auflistung der Publikationen, Vorträge, Poster und Preise

9.5.1 Veröffentlichungen in peer – reviewed Journalen und Monographien

Z. Brenn – Struckhova, M. Cichna – Markl*. Determination of bisphenol A in wine by sol – gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection. *Food Add. Contam.* 23 (2006) 1227–1235.

Z. Brenn – Struckhova, M. Cichna – Markl*, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Selective sample cleanup by reusable sol – gel immunoaffinity columns for determination of deoxynivalenol in food and feed samples. *Anal. Chem.* 79 (2007) 710–717.

C. Böhm, M. Cichna – Markl, Z. Brenn – Struckhova, E. Razzazi – Fazeli*. Development of a selective sample clean – up method based on immuno – ultrafiltration for the determination of deoxynivalenol in maize. *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 111–117.

Z. Brenn – Struckhova, C. Füreder, M. Cichna – Markl*, E. Razzazi – Fazeli. Co – isolation of deoxynivalenol and zearalenone with sol – gel immunoaffinity columns for their determination in wheat and wheat products. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5828–5837.

9.5.2 Vorträge

M. Cichna – Markl, R. Stidl, T. Hrebicek, R. Braunrath, D. Podlipna, Z. Brenn – Struckhofova, S. Padlesak, K. Schöringhumer. Selective extraction with biomolecules entrapped by the sol – gel method. Eighth International Symposium on Advances in Extraction Techniques 2006, 6.–8. 2. 2006, York, UK.

E. Razzazi – Fazeli, M. Cichna – Markl, C. Böhm, Z. Brenn – Struckhofova. Neue Ansätze in der immunanalytischen Probenvorbereitung von DON. 28. Mycotoxin – Workshop, 29. – 31. 5. 2006, Bydgoszcz, Poland.

E. Razzazi – Fazeli, M. Cichna – Markl, C. Böhm, E. Reiter, Z. Brenn – Struckhofova, G. Sontag. Probenvorbereitung in der Analyse von Mykotoxinen. Die Alternativen zu Einweg – Immunaффinitätssäulen. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2006, 12.–14. 9. 2006, Wien.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Selektive Probenvorbereitung mit Sol – Gel – Immunaффinitätssäulchen zur Bestimmung von Deoxynivalenol. 10. Mold Meeting, 23.–24. 11. 2006, Linz.

E. Razzazi – Fazeli, M. Cichna – Markl, C. Böhm, Z. Brenn – Struckhofova. New strategies for selective sample clean – up based on immunological methods for the determination of deoxynivalenol in food and feed samples. XIIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 21.–24. 5. 2007, Istanbul, Turkey.

M. Cichna – Markl, Z. Brenn – Struckhofova, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Neue Strategien zur selektiven Probenvorbereitung mittels immunologischer Methoden für die Bestimmung von Deoxynivalenol in Lebens– und Futtermitteln. 1. Meeting of the Vienna Research Platform of Nutrition and Food Sciences. 25. 4. 2008, Wien.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Selektive Probenvorbereitung mit wiederverwendbaren Sol – Gel Immunaффinitätssäulen zur Bestimmung von Deoxynivalenol in Lebens – und Futtermitteln. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2008, 28. – 30. 5. 2008, Eisenstadt.

9.5.3 Poster

Z. Brenn – Struckhofova, S. Padlesak, M. Cichna – Markl. Selective clean – up by immunofiltration/ultrafiltration for determination of bisphenol A in canned beverages. 2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2. – 4. 11. 2005, Prague, Czech Republic.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl. Determination of bisphenol A in wine samples by sol – gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection. 2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2. – 4. 11. 2005, Prague, Czech Republic.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Stabilität von mittels der Sol – Gel – Methode hergestellten DON – Immunaффinitätssäulen. 28. Mycotoxin Workshop, 29. – 31. 5. 2006, Bydgoszcz, Poland.

C. Böhm, Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, E. Razzazi – Fazeli. Optimierung der Immun – Ultrafiltrationsmethode zur Probenvorbereitung von DON. 28. Mycotoxin Workshop, 29. – 31. 5. 2006, Bydgoszcz, Poland.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Probenvorbereitung mit Sol – Gel – Immunaффinitätssäulen zur Bestimmung von Deoxynivalenol. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2006, 12.– 14. 9. 2006, Wien.

C. Böhm, Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, E. Razzazi – Fazeli. Optimierung einer Immun – Ultrafiltrationsmethode zur Probenvorbereitung von Deoxynivalenol. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2006, 12. – 14. 9. 2006, Wien.

C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli, Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl. Immunultrafiltration – eine Alternative zur Immunaффinitätschromatographie. 10. Mold Meeting, 23. – 24. 11. 2006, Linz.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, C. Böhm, E. Razzazi – Fazeli. Co – extraction of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone from wheat by sol – gel immunoaffinity chromatography. 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. 7. – 9. 11. 2007. Prague, Czech Republic.

C. Füreder, Z. Brenn – Struckhofova, E. Razzazi – Fazeli, M. Cichna – Markl. Wieder verwendbare sol – gel – Immunaффinitätssäulen zur Isolierung von Deoxynivalenol in Lebensmitteln. 1. Meeting of the Vienna Research Platform of Nutrition and Food Sciences. 25. 4. 2008, Wien.

C. Füreder, Z. Brenn – Struckhofova, E. Razzazi – Fazeli, M. Cichna – Markl. Anwendbarkeit von sol – gel – Immunaффinitätssäulen zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von Deoxynivalenol in komplexen Lebensmitteln. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2008, 28. – 30. 5. 2008, Eisenstadt.

Z. Brenn – Struckhofova, M. Cichna – Markl, E. Razzazi – Fazeli. Co – Isolierung von Deoxynivalenol und Zearalenon mit sol – gel – Immunaффinitätssäulen. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2008, 28. – 30. 5. 2008, Eisenstadt.

9.5.4 Preise

Roland W. Frei Poster Award, 2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2. – 4. 11. 2005, Prague.

Czedik – Eysenberg Preis, Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 2008, 28. – 30. 5. 2008, Eisenstadt.

9.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am:	23. September 1978, in Brünn, Tschechien
Familienstand:	verheiratet
Staatsbürgerschaft	tschechische

Schulbildung:

09/85 – 06/93	Besuch der Grundschule in Modřice
09/93 – 06/97	Schülerin des Gymnasiums Křenová in Brünn
05/97	Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

Studium:

10/97 – 06/99	Studium der Chemie an der Technischen Universität in Brünn
10/99 – 09/05	Studium der Chemie an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien
10/04 – 09/05	Diplomarbeit mit dem Thema „Immunaффinitätschromatographie und Immunfiltration zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von Bisphenol A in Wein“ bei Univ. Prof. Dr. G. Sontag in der Abteilung für Lebensmittelchemie am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien; Studium mit Erfolg abgeschlossen
10/05 – 09/07	Praktische Arbeit an der Dissertation mit dem Thema „Development of immunoanalytical methods for sample preparation in the analysis of the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenon (ZON) in food and feed“ bei Univ. Prof. Dr. G. Sontag in der Abteilung für Lebensmittelchemie am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien

Berufstätigkeit:

Seit 1.10.2005	Als Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Wien beschäftigt
Seit 1.11.2007	Als Wissenschaftliche Mitarbeiterin in Seibersdorf – Labor GmbH beschäftigt

Tutorentätigkeit:

WS 2004	Tutorin im Lebensmittelanalytischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler und im Lebensmittelchemischen Praktikum B für Chemiker an der Universität Wien
---------	--

Lektorentätigkeit:

WS 2005	Lektorin im Lebensmittelanalytischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler der Universität Wien
SS 2006	Lektorin im Lebensmittelanalytischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler und im Lebensmittelchemischen Praktikum A für Chemiker an der Universität Wien
WS 2006	Lektorin im Lebensmittelanalytischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler und im Lebensmittelchemischen Praktikum B für Chemiker an der Universität Wien
SS 2007	Lektorin im Lebensmittelanalytischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler und im Lebensmittelchemischen Praktikum A für Chemiker an der Universität Wien

9.7 Abstract

This dissertation is attended to sample preparation for determination of mykotoxins deoxynivalenol (DON) und zearalenone (ZON) in food and feed.

The determination of DON was carried out by HPLC with UV – detection, ZON was determined by HPLC with fluorescence detection. Both mykotoxins were also determined by LC / MS.

The sample preparation was carried out by means of immunoaffinity chromatography. Therefore the monoclonal DON – respectively, ZON – Antibodies (AB) were immobilised into a Sol – Gel – Glass and packed into empty columns.

Three types of Sol – Gel – immunoaffinity columns were developed: columns with only DON – AB immobilised (DON – IAC), with only ZON – AB immobilised (ZON – IAC) and columns with both Antibodies immobilised (DON/ZON – IAC).

The methods for DON – IAC and ZON – IAC were developed each with standard solutions of DON or ZON. The particular steps of procedure were optimized for maximum recovery of analytes. For the loading step: optimal loading medium, pH – range, loading rate, influence of loading volume and concentration of the loaded solution were determined. For the washing Step: suitable washing solution was chosen. For the elution step: solution and solution volume were defined.

Further, reproducibility of IAC – manufacturing, conditions and period of storage, intra – and interday reproducibility of the method and reusability of IAC were investigated.

The developed methods were used for sample preparation of wheat meal, wheat grist, maize meal, und spaghetti. The limits of detection and recovery rates were determined.

For DON/ZON – IAS it was examined, if during the immobilisation neither coagulation nor interference of DON – AB and ZON – AB occurs. The method was established as combination of the DON – IAS und ZON – IAS Methods. This method was used for sample preparation of wheat meal, limit of detection and recovery rate were determined.

Finally, the detection of DON and ZON in the samples was verified by LC / MS, and limits of detection and recovery rates were determined as well.

All determined recovery rates ranged between 85 and 99 %.

The Sol – Gel – immunaffinity columns were 20times reusable, without observable lost of performance. They could be stored for 6 months at 4 °C as well as at room temperature, without any addition of bacteriostatics.

Diese Dissertationsarbeit befasst sich mit der Probenvorbereitung zur Bestimmung der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) in Lebens – und Futtermitteln.

Die Bestimmung von DON erfolgte mittels HPLC mit UV – Detektion, die Bestimmung von ZON mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Beide Mykotoxine wurden ebenfalls mittels LC / MS bestimmt.

Die Probenvorbereitung erfolgte mit Hilfe von Immunoaffinitätschromatographie. Dazu wurden monoklonale DON – bzw, ZON – Antikörper (AK) im Sol – Gel – Glas immobilisiert und in leere Säulen gepackt.

Es wurden 3 Arten von Sol – Gel – Immunoaffinitätssäulen entwickelt: Säulen, in denen nur DON – AK immobilisiert waren (DON – IAS), Säulen, in denen nur ZON – AK immobilisiert waren (ZON – IAS) und Säulen, in denen beide Antikörperarten immobilisiert waren (DON/ZON – IAS).

Für DON – IAS und ZON – IAS wurden jeweils zuerst mit Standardlösungen Methoden entwickelt und die einzelnen Arbeitsschritte im Hinblick auf maximale Analytwiederfindung optimiert, wie zum Beispiel: beim Aufgabeschritt das optimale Aufgabemedium, der pH – Bereich, die Aufgabegeschwindigkeit ermittelt, der Einfluss vom Aufgabevolumen und Konzentration der Aufgegebenen Lösung, für Waschschrift ein geeignetes Waschmedium gesucht, und für den Elutionsschritt das optimale Elutionsmedium und Elutionsvolumen.

Weiters wurden die Reproduzierbarkeit der Herstellung, die Lagerungsbedingungen und die Lagerfähigkeit, die Intra – und Interday Reproduzierbarkeit der Methode und die Wiederverwendbarkeit der Säulen untersucht.

Danach wurden diese Methoden zur Aufarbeitung von Realproben (Weizenmehl, Weizenschrot, Maismehl und Spaghetti), angewendet. Es wurden die Nachweisgrenzen und die Wiederfindungen bestimmt.

Bei DON/ZON – IAS wurde zuerst überprüft, dass DON – AK und ZON – AK bei der Immobilisierung weder co-agulieren noch sich gegenseitig behindern. Die Methode wurde durch Vereinigen der vorher entwickelten Methoden für DON – IAS und ZON –

IAS gewonnen. Auch diese Methode wurde an Realproben angewendet und die Nachweisgrenzen und Wiederfindungen bestimmt.

Zum Abschluss wurde die Detektion von DON und ZON in Realproben mittels LC / MS überprüft und ebenfalls die Nachweisgrenzen und Wiederfindungen bestimmt. Alle Wiederfindungen bewegten sich zwischen 85 und 99 %.

Die Säulen könnten 20mal wieder verwendet werden, ohne einen merklichen Leistungsabfall zu zeigen. Sie konnten mindestens 6 Monate sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur gelagert werden, für die Lagerung war Zusatz eines Bakteriostatikums nicht notwendig.